

**OPTIMIERUNG EINER NACHWEISMETHODE
FÜR COFFEIN , BARBITURATE , BENZODIAZEPINE
UND IHRE METABOLITE MIT DER H P L C ,
FÜR DIE FORENSISCH - TOXIKOLOGISCHE PRAXIS**

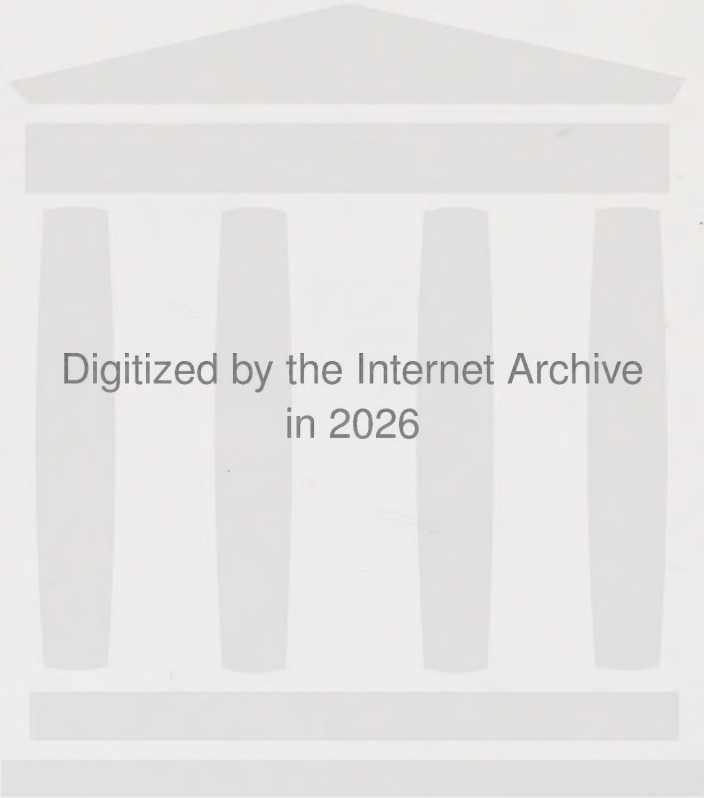
ANDREA MARTIN

1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand : Prof.Dr.med. Wolfgang Spann

Optimierung einer Nachweismethode für
Coffein, Barbiturate, Benzodiazepine
und ihre Metabolite mit der HPLC,
für die forensisch-toxikologische Praxis

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andrea Martin

aus

Lucenec

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Dr. Gustav Drasch

Mitberichterstatter: Dr. Ludwig von Meyer

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: **28. 7. 1987**

Gewidmet

meinen Eltern

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Aufgabenstellung.....	1
1.2.	Die Stellung der Hypnotika und Psychopharmaka auf dem Arzneimittelmarkt.....	1
1.3.	Die Bedeutung der Hypnotika und Psychopharmaka in der Gerichtsmedizin.....	3
1.4.	Pharmakologie der untersuchten Substanzen.....	6
1.4.1.	Coffein.....	6
1.4.2.	Barbiturate.....	7
1.4.3.	Benzodiazepine.....	11
1.5.	Hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode.....	18
1.5.1.	Vorteile.....	18
1.5.2.	Grundbegriffe.....	20
2.	Untersuchungsergebnisse.....	26
2.1.	Verlauf der Untersuchungen.....	26
2.2.	Optimierung der Untersuchungsbedingungen.....	27
2.2.1.	Gerät.....	27
2.2.2.	Säule.....	28
2.2.3.	Temperatur.....	33
2.2.4.	Abschwächung und Einspritzvolumen.....	35
2.2.5.	Automatische Programmänderung oder Elimination der Störspitzen durch Änderung der Steigung der Grundlinien.....	38
2.2.6.	Wellenlänge.....	40
2.2.7.	Elutionsmittel.....	43
2.2.8.	Elutionsmittel und Wellenlänge.....	44
2.2.9.	Die Retentionszeiten und die K' - Werte der 1 mg %igen Standardlösungen von Benzodiazepinen, Barbituraten, Coffein und MPPH bei den optimierten Nachweisbedingungen.....	56
2.3.	Herstellung der untersuchten Lösungen, Appli- kation des Nachweisverfahrens und Auswertung der erhaltenen Daten.....	58

2.3.1.	Standardlösungen.....	58
2.3.2.	Bestimmung der Nachweisgrenze.....	59
2.3.3.	Bezugsubstanz.....	61
2.3.4.	Berechnung der Ausbeuten.....	63
2.3.5.	Blutproben.....	64
2.3.5.1.	NH_3 - Puffer.....	65
2.3.5.2.	CH_3COOH - Puffer.....	65
2.4.	Anwendung in der täglichen Praxis.....	72
3.	Diskussion.....	74
4.	Zusammenfassung.....	77
5.	Literaturverzeichnis.....	78
6.	Lebenslauf.....	88

1. Einleitung

1.1. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ein Nachweisverfahren für die qualitative und quantitative Simultanbestimmung von Arzneimitteln in Blutproben, wie sie in der forensischen Toxikologie gebraucht werden, zu optimieren.

Das Nachweisverfahren wurde für insgesamt 58 pharmakologisch wirksame Reinsubstanzen, davon für alle in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Barbiturate, Benzodiazepine sowie ihre wichtigsten Metabolite und für Coffein ausgearbeitet.

Nach der Feststellung der optimalen Analysebedingungen wurden die erhaltenen Ergebnisse auf ihre Wiederholbarkeit überprüft, mit den Angaben anderer Autoren verglichen und durch andere Nachweisverfahren bestätigt.

Es wurde Wert darauf gelegt, mit einfachen Systemen auszukommen, damit das ausgearbeitete Verfahren in den täglichen Routineuntersuchungen der forensischen Toxikologie angewendet werden kann.

1.2. Die Stellung der Psychopharmaka und Hypnotika auf dem Arzneimittelmarkt

Der Wunsch großer Bevölkerungsgruppen unserer westlichen Zivilisation schon geringe psychische Anspannungen und somatische Indispositionen wie z.B. auch Schlafstörungen, Angst, Spannungs- oder Verstimmungszustände zu meiden, hat zu wachsender Vielfalt neuer Medikamente geführt.

Einen beträchtlichen Anteil an dieser Entwicklung haben die Psychopharmaka und Hypnotika.

Unter den Hypnotika waren jahrzehntelang die Barbiturate die meist verordneten Arzneimittel (Hofler 1977). Seit den 70er Jahren wurden die Barbiturate immer mehr durch Benzodiazepine, die heute die am häufigsten verordnete Arzenimittelgruppe darstellen (Muller 1982), aus ihrer führenden Position vollkommen verdrängt.

Dazu einige Zahlen:

Der Umsatz an Tranquilizern lag schon im Jahre 1956 in der USA bei 175 Millionen Dollar (Knabe 1962). In der Zeit von 1956 bis 1961 war der Verbrauch an solchen Pharmaka in der DDR um rund 1000% im Vergleich zu den vorhergehenden Jahren angestiegen (Linke 1962). Labhard nennt schon 1966 zweitausend Stoffe, die eine psychotrope Wirkung aufweisen. Nach Peters und Seidel (1970) wurde 1968 Diazepam im Werte von 38 Millionen DM in der Bundesrepublik Deutschland hergestellt. Das entspricht ca. 500 000 Packungen aller Großen pro Monat. Nach Angaben der Arzneimittel-Informationsdienst GmbH Berlin, die mit einiger Vorsicht zu behandeln sind, verkauften die bundesdeutschen Apotheker im Jahre 1979 ca. 1,8 Milliarden Benzodiazepin Tabletten (Schmidt 1982). Nach Moebius (1981) gehören die Benzodiazepine zu den Medikamenten, die am häufigsten verschrieben werden. Etwa 40 Milliarden Einzeldosen sollen taglich auf der ganzen Welt konsumiert werden.

In der Bundesrepublik sollen etwa 18% der männlichen und 27% der weiblichen Bevölkerung ein Präparat der Benzodiazepingruppe einnehmen (Moebius 1981).

Die sehr hohen Verkaufsziffern dieser Medikamentengruppen lassen darauf schließen, daß die meisten Einnahmen nicht unbedingt indiziert sind.

1.3. Die Bedeutung der Hypnotika und Psychopharmaka in der Gerichtsmedizin

Für die Gerichtsmedizin und die forensische Toxikologie hat die Tendenz zum ständig steigenden Verbrauch und Mißbrauch dieser Arzneimittelgruppen vielfache Bedeutung:

1. Schon therapeutische Dosen, sowohl der Barbiturate, als auch der Benzodiazepine beeinträchtigen das Reaktionsvermögen. Daher müssen sie, insbesondere im Straßenverkehr und bei der Ausübung aller, mit hohem Konzentrationsvermögen verbundenen Tätigkeiten berücksichtigt werden. (Römer 1982, Dorn 1970, Pribilla 1964, Wagner 1963).
2. Es besteht ein Potenzierungseffekt bei der Wechselwirkung zwischen Medikament und Alkohol (Ditt 1963, Mallach 1975, Clarmann 1982).
3. Auch eine Wechselwirkung mit gleichzeitiger Einnahme anderer Arzneimittel ist nachgewiesen (Clarmann 1982, Römer 1982).
4. Folgende Mißbrauchformen der Barbiturate und Benzodiazepine sind bekannt:
 - Mißbrauch zu Suizidzwecken
 - Mißbrauch zur Bewältigung von Alltagsstreß und Schlafstörungen
 - Suchtmäßiger Mißbrauch

Diese drei Mißbrauchphänomane stehen vermutlich in Zusammenhang: so sollen unter den Suizidenten, die Benzodiazepine genommen haben, viele Benzodiazepin-Abhängige sein. Und aus dem Benzodiazepin-Mißbrauch zur Bewältigung von Alltagsstreß geht nicht selten eine Abhängigkeit hervor (Poser 1982).

Poser (1982) nennt Suchtkrankheiten als den häufigsten Aufnahmegrund in psychiatrische Kliniken der Bundesrepublik. Etwa ein Drittel aller aufgenommenen Patienten sollen abhängig sein. Als mit Abstand die häufigste Abhängigkeitsform nennt er: Alkoholismus gefolgt von kombinierter Alkohol und Medikamentenabhängigkeit. Illegale Drogen sollen quantitativ nur eine untergeordnete Rolle spielen. Nach Poser (1982) sind seit 1978 die Benzodiazepine unter den Medikamenten die häufigsten Suchtstoffe, vorher waren es Bromharnstoffe, Diäthylpentenamid und Barbiturate, wobei das Diazepam das viele Jahre lang das führende Präparat war, in der Reihe der Abhängigkeit erzeugenden Benzodiazepinverbindungen klar an erster Stelle steht.



Entsprechend der Letalität nach einer Vergiftung mit Schlafmitteln und anschließender klinischer Behandlung wurde von Clarmann (1982) folgende Gefährlichkeitsrangfolge ermittelt:

1. diathylpentenamid-haltige Schlafmittel (Letalität von 9,89%)
2. methaqualon-haltige Schlafmittel (Letalität von 6,97%)
3. barbiturat-haltige Schlafmittel (Letalität von 3,89%)
4. bromcarbamid-haltige Schlafmittel (Letalität von 1,57%)
5. Athanol (Letalität von 0,39%)
6. Benzodiazepine (Letalität von 0,0%)

Da aber die Barbiturate leicht zugänglich sind, kommen akzidentelle und vor allem suizidale Barbiturat-Vergiftungen relativ häufig vor (Lang 1960). In den zivilisierten Ländern sind die Barbiturat-Vergiftungen bei Erwachsenen die häufigste Suizidart, im Kindesalter kommen Intoxikationen als Unglücksfälle vor (Forth 1983). Die Benzodiazepine verdrängten in den letzten Jahren auf dem Arzneimittelmarkt die Barbiturate. Durch ihre breite Verbreitung gehören sie zu den am häufigsten in suizidaler Absicht eingenommenen Medikamenten und sind entsprechend oft auch bei den akzidentellen Vergiftungen im Kindesalter vertreten, wobei am häufigsten die Kinder zwischen dem 1. bis 3. Lebensjahr betroffen sind (Römer 1982).

Die Gefahr einer akuten Vergiftung mit Benzodiazepinen ist minimal. Sie sind als Mittel zum Suizid praktisch untauglich (Apelt 1982). Die maximalen Dosen, die bei einer Monovergiftung überlebt wurden, lagen nach Leutner (1978):

- für Nitrazepam bei 1000 mg (200 Tabletten)
- für Flurazepam bei 2400 mg (80 Tabletten)
- für Diazepam bei 2000 mg (200 Tabletten / 10 mg)
- für Flunitrazepam bei 50 mg (25 Tabletten)

Auf der anderen Seite berichtet von Clarmann (1982) über Todesfälle. Danach handelt es sich sowohl um Kombinationsvergiftungen (z.B. mit Alkohol, oder Diazepam und Paraldehyd, Diazepam und Phenobarbital), wie auch um isolierte Benzodiazepin Vergiftungen (z.B. mit Flunitrazepam, Flurazepam, Bromazepam, Diazepam u.a.). Auch Römer (1982) berichtet über die akute Intoxikation mit Benzodiazepinen. Er registrierte und wertete einige Fälle der Berliner Beratungsstelle für Vergiftungserscheinungen aus.

5. Beachtenswert für den Toxikologen ist ferner die Rolle der Psychopharmaka und Sedativa im Rahmen der Antidopingskontrollen. Unter das Verbot aufputschender Substanzen (festgelegt unter § 1,2 der Rahmenrichtlinien des Deutschen Sportbundes zur Bekämpfung des Dopings) fallen neben den Phenylaethylaminoabkömmlingen auch Präparate, die zur Wirkstoffgruppe der Benzodiazepine gehören (Bohn 1971).
6. Die zentrale Rolle in der Gerichtsmedizin nimmt der Nachweis der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen bei der Beurteilung der Schuldunfähigkeit (§ 20 des Strafgesetzbuches) oder der verminderten Schuldfähigkeit (§ 21 des Strafgesetzbuches) . Es geht in diesem Zusammenhang um die Klärung, ob die Einsichtsfähigkeit oder die Fähigkeit nach dieser Einsicht zu handeln - d.h. die Steuerungsfähigkeit vermindert oder aufgehoben war oder ist. Weiter geht es in diesem Zusammenhang um die Problematik der vorverlegten Schuld (Vollrauschparagraph).

1.4. Pharmakologie der untersuchten Substanzen

1.4.1. Coffein

Coffein zählt zu den ältesten Genuß- und Arzneimitteln.

(Forth 1983).

Es hat eine psychoanaleptische Wirkung; es wirkt vornehmlich auf die Hirnrinde, wobei der Effekt therapeutischer Mengen von der Ausgangslage des Menschen (Ermüdung, Gewohnung usw.) abhängig ist; außerdem wirkt es stimulierend auf die Magensaftsekretion, fordert die Diurese und in großen Dosen erregt es auch das Gefäß - und Atemzentrum (Kuschinsky 1981).

Therapeutische Anwendung findet es vor allem bei Herz - und Kreislaufstörungen, bei Hirndurchblutungsstörungen und in zahlreichen Kombinationspräparaten (Forth 1983).

Coffein wird vor allem nach dem Abbau durch Oxidation und Demethylierung und nur ein kleiner Teil auch unverändert von der Niere ausgeschieden (Kuschinsky 1981). Über den Metabolismus von Coffein berichtet z.B. Sved (1976).

Ab einer Dosis von 1 g Coffein treten beim Erwachsenen Schlaflosigkeit, Unruhe und Erregungserscheinungen bis zum leichten Delir auf, verbunden mit Hör- und Sehstörungen, sowie Tachykardie und Extrasystolen. Die tödliche Dosis für Menschen liegt bei ca. 10g.

Es sind zahlreiche Fälle bekannt geworden, bei denen ein Abusus oder eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Coffein zum Auftreten eines chronischen Vergiftungsbildes (Unruhe und Schlaflosigkeit, Tachykardie, Extrasystolie) geführt haben (Forth 1983, Monitor 1976).

1.4.2. Barbiturate

Barbiturate sind Derivate der Barbitursäure, die 1864 von Adolf von Bayer als Kondensationsprodukt von Malonsäure mit Harnstoff synthetisiert wurden (Bayer 1864).

Als erstes Derivat wurde 1903 die Diäthylbarbitursäure (Barbital) unter dem Handelsnamen Veronal^R von Fischer und von Mering in die Medizin eingeführt. (Fischer, Mering 1903). Seit dieser Zeit wurden mehr als 2000 Barbitursäure-Derivate hergestellt, von denen wiederum 20 durch ihre ausgeprägten sedativ-hypnotischen Eigenschaften auffallen (Clark 1938).

Die Beziehungen zwischen Struktur und Wirksamkeit der Barbiturate wurden intensiv untersucht (Clark 1938). Die unsubstituierte Barbitursäure besitzt, aufgrund ihrer zu großen Acidität ($pK_a=4,0$) und der damit verbundenen geringen Lipidlöslichkeit, keine sedativ-hypnotischen Eigenschaften. Auch die 5-Monoalkyl und die 5-Monoaryl-Derivate sind nicht hypnotisch wirksam. Werden dagegen beide Wasserstoffe an C-5 durch Alkyl-oder Arylreste substituiert, entstehen Barbitursäure-Derivate mit starker sedativ-hypnotischer Wirksamkeit. Bei einer Verlängerung der n-Alkylreste in C-5 Stellung bis zu 7-8C Atomen steigt die sedierende-hypnotische Wirksamkeit zunehmend an, bei weiterer Verlängerung fällt sie jedoch wieder ab (Dox 1922). Verzweigt-kettige Verbindungen sind wirksamer und weniger toxisch als nicht verzweigte (Shonle 1923). Durch die Einführung von polaren Gruppen, wie Hydroxyl-, Keto-, Amino-oder Carboxylgruppen wird die hypnotische Wirksamkeit, wahrscheinlich durch die verringerte Lipidlöslichkeit, vermindert. Eine größere Lipidlöslichkeit, schnelleren Wirkungseintritt, aber auch geringere Wirkungsdauer haben die N-Alkyl-Barbiturate, die durch die Substitution einer Alkyl-Gruppe an einem Stickstoffatom im Barbitursäurering entstehen. Eine weitere Steigerung der Lipophilie wird durch Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel bei C-2 erzielt (Waleczek 1981). Diese Thiobarbiturate zeigen gegenüber den Oxybarbituraten einen raschen Wirkungseintritt. Sie werden heute als sogenannte Kurznarkotika in der Klinik eingesetzt (Waleczek 1981).

Die Barbiturate werden in ultra kurz, kurz, mittellang und lang wirksame eingeteilt.

Dosisabhängig bewirken sie: Sedierung ($\approx$) Schlaf ($\approx$) Narkose ($\approx$) Koma $\rightarrow$ Tod (Forth 1983).

Sie werden im Magen resorbiert, im Blut ist der nicht an Albumin gebundener Anteil teils ionisiert und wird durch die Niere ausgeschieden, wobei die Alkalisierung des Harns die Elimination erhöht (Forth 1983).

Der Abbau erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum - vorwiegend der Leberzelle. Nach Demethylierung oder Desulfurierung entstehen hypnotisch noch wirksame Metaboliten; die Oxidationsprodukte sind hydrophil, unwirksam und sie werden renal rasch eliminiert; Barbital und Phenobarbital, die größtenteils unverändert den Organismus verlassen haben dagegen sehr lange Verweildauer (Halbwertszeit Barbital: 4-5 Tage, Phenobarbital 3 Tage) und bei chronischer Anwendung kumulieren sie am stärksten (Forth 1983, Kuschinsky 1981, Dark 1973).

Barbiturate finden therapeutische Verwendung als Sedativa, Hypnotika, injizierbare Narkotika, funktionelle Antagonisten bei Vergiftungen mit konvulsiv wirkenden Stoffen, nach Überdosierung von Lokalanästhetika und als Antiepileptika (Forth 1983).

Bisher ist es nicht gelungen, den eigentlichen Wirkungsmechanismus der Barbiturate aufzuklären. Einige Befunde sprechen dafür, daß die Permeabilitäten des Plasma und der Zytomembranen von Hirnzellen vermindert werden (Kuschinsky 1981).

Außer der membranstabilisierenden Wirkung an Axonen ist für sie an der Synapse ein prasynaptischer (Hemmung der Transmitterfreisetzung) als auch ein postsynaptischer Effekt (Empfindlichkeitsabnahme des Rezeptors für den physiologischen Transmitter) nachgewiesen und eine Beeinflussung der GABA-ergen Hemmwirkung am Neuron (Verstärkung des Hemmeffektes der freigesetzten GABA) wird neuerdings in Erwägung gezogen (Kuschinsky 1981).

Die Barbiturate greifen in die normale Physiologie des Schlafes ein, indem sie die Stadien 1,2 und 3 reduzieren, vor allem aber den REM-Schlaf unterdrücken (Kales 1975, Leutner 1978).

Sie beeinflussen die Verkehrstüchtigkeit.

Nach höheren Dosen treten auf:

- Schläfrigkeit am Tage ("hang-over"),
- Gleichgewichtsstörungen,
- Trunkensein,
- Ataxie,
- eingeschränktes Urteilsvermögen;

oft auch:

- morgendliche Erschöpfung,
- Schwindelgefühl,
- Lethargie;

vorwiegend bei älteren Menschen:

- unbestimmte gastrointestinale Schmerzen,
- Hautreaktionen (Ödeme, Exantheme) (Forth 1983).

Sie aktivieren die δ -aminolävulinsäure-Synthese, wodurch die Porphyrinkörper-Entstehung ansteigt (Kuschinsky 1981).

Wie alle Schlafmittel verstärken auch die Barbiturate die zentrale Wirkung des Alkohols (Forth 1983).

Bei manchen Menschen wirken Barbiturate nicht sedativ-hypnotisch, sondern erregend: paradoxe Barbiturat-Wirkung. Diese Tendenz wird durch Einnahme von Coffein und anderen Stimulantien verstärkt.

Die Erregung kann eine euphorische Komponente enthalten; damit sind die notwendigen Charakteristika für die Auslösung einer Sucht gegeben (Kuschinsky 1981).

Bei Barbituratsüchtigen kommen Dosissteigerungen bis zum Faktor 10 - 15 gegenüber der Norm vor (Forth 1983).

Seit 1964 ist diese Form psychischer und physischer Abhängigkeit von der WHO als "Barbiturat-Alkohol" - Typ charakterisiert (Leutner 1978).

Innerhalb weniger Therapietage kommt es zu einem Wirkungsverlust (Kales 1970, 72, 75, 77). Die erhöhte Abbaugeschwindigkeit ist auf eine Aktivitätszunahme der entsprechenden Enzyme zurückzuführen.

Dieser Mechanismus, als Enzyminduktion bezeichnet, hat eine Barbituratgewöhnung und daraus resultierende Abhängigkeit zur Folge. Um den gleichen Effekt zu erreichen, muß die Dosis nach wenigen Tagen erhöht werden. Da gleichzeitig die Aktivität anderer, dem Abbau dienender Enzyme erhöht wird, entstehen Arzneimittelinterferenzen und unerwünschte Wirkungsverluste. Betroffen sind z.B. Antikoagulantien vom Cumarin-Typ und Antiepileptika. Außer der Enzyminduktion ist der Wirkungsverlust von Barbituraten durch adaptive Vorgänge in ZNS zu erklären (z.B. Beeinflussung des Zusammenspiels zwischen Transmitter und Rezeptor an der zentralnervösen Synapse) (Forth 1983).

Nach längerer Anwendung hat ein abruptes Absetzen der Barbiturate einen REM-Rebound zur Folge: der REM-Schlaf ist relativ verlängert, der Schlaf ist unruhig, es kommt zur Entwicklung von Alpträumen und Schlaflosigkeit (Kales 1974).

Bis in die jüngste Zeit gehörten die Barbiturate zu den meist verschriebenen Schlafmitteln. Diese führende Stellung wurde in den letzten Jahren durch andere Pharmaka, vor allem durch die Benzodiazepine abgelöst (Vermeulen 1980).

Wegen den vielen Nebenwirkungen sollen die Barbiturate heute nach Möglichkeit (mit beschränkter Ausnahme bei Alterspatienten) nicht mehr verordnet werden (Schmidt 1982, Albert 1982).

Sie bleiben dennoch für die klinische Pharmakologie weiterhin von großer Bedeutung.

Angaben über die Analysemöglichkeiten der Barbiturate sind z.B. in Studien von Preuß (1979) zusammengefaßt.

1.4.3. Benzodiazepine

Schon im Jahre 1891 war den deutschen Forschern Auvers und Meyenburg der Grundtyp der Benzodiazepine bekannt. (Auvers 1891).

Im Jahre 1895 berichtete Meyenburg in seiner Habilitationsarbeit unter anderem über die Verwendung der Oxazine und Oxadiazine in der Farbstoffherstellung (Meyenburg 1895).

Im Jahre 1934 arbeitete Sternbach - nur vorübergehend mit diesen Grundverbindungen, die für ihn eine Fülle von chemischen Variationsmöglichkeiten boten. Später, in der Mitte der fünfziger Jahre, kam er, auf der Suche nach geeigneten, ausbaufähigen Verbindungen, deren Derivate den pharmakologischen Eigenheiten gerecht werden konnten, erneut auf den Grundtyp des Benzo-Oxodiazines zurück (Höfler 1977). Es entstand daraus, am Anfang einer Benzodiazepinreihe das Chlordiazepoxid, bekannt unter dem Handelsnamen Librium, das 1960 auf dem Arzneimittelmarkt eingeführt wurde. Seitdem wurden eine ganze Reihe von weiteren Strukturanaloga entwickelt.

All diese Substanzen weisen ein typisches und breites Wirkungsspektrum auf, wobei man im wesentlichen 4 voneinander unabhängige Einzelkomponenten unterscheiden muß:

1. sedative, hypnotische aber - im Unterschied zu Barbituraten - in hohen Dosierungen keine direkten narkotischen Eigenschaften
2. krampflösende, antikonvulsive Eigenschaften
3. angst- und spannungslösende Wirkungen
4. eine über zentrale Mechanismen vermittelte Senkung des Tonus der quergestreiften Muskulatur (Antoniadis 1981)

Aufgrund von diesen Wirkungscharakteristika werden die Benzodiazepine eingesetzt bei der Behandlung von:

nervösen Unruhezuständen; Schlafstörungen; als Antiepileptika (Status epilepticus und Behandlung der Epilepsie im Kindesalter) (Klotz 1982, Sternbach 1982); bei Behandlung zentraler Erregungszustände wie Alkohol und Drogenentzugssymptome, Krämpfe;

bei Angstneurosen; Behandlung der Angstzustände bei psychosomatischen Erkrankungen; als Muskelrelaxantien bei Muskelspasmen verschiedener Genese, so auch bei der Tetanustherapie und in der Narkoseprämedikation (Antoniadis 1981, Römer 1982).

Der Hauptangriffsort der Benzodiazepine ist das limbische System. Die Neurone der Corpora amygdala werden in ihrer Aktivität besonders stark reduziert (Römer 1982). Die Benzodiazepine dämpfen die vom limbischen System ausgehende Aktivierung des "Wach-Systems" in der Formatio reticularis und sie wirken so indirekt schlaffördernd (Forth 1983).

Die muskelrelaxierende Wirkung beruht auf einer Funktionsreduzierung der Interneurone im Rückenmark. Die polysynaptischen Reflexe werden abgeschwächt, ohne daß die monosynaptischen wesentlich beeinflußt werden. Außerdem haben die Benzodiazepine eine dämpfende Wirkung auf die zentralmotorischen Kerne (z.B. Formatio reticularis) und dadurch antikonvulsive Eigenschaften (Römer 1982, Müller 1982). Die leichte anticholinerge Wirkung führt zur Erhöhung des Augeninnendruckes, zu Mundtrockenheit, Miktionshemmung und Obstipation (Römer 1982).

Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen führt heute zu der Annahme, daß ZNS-spezifische, hochaffine Bindungsstellen für Benzodiazepine (Benzodiazepin-Rezeptoren) der Ort sind, an dem die pharmakologischen und therapeutischen Wirkungen der Benzodiazepine vermittelt werden (Müller 1982).

Nach heutigem Wissensstand verstärken die Benzodiazepine prä- und postsynaptisch die hemmende Funktion der GABA-erger Neurone (Oelschläger 1982). Viele Studien lassen vermuten, daß der Benzodiazepin-Rezeptor als Verstärkersystem für die GABA-erge Hemmung dient, wobei Benzodiazepine die GABA-erge Hemmung verstärken. Es ist noch unklar, wie es über diese Wechselbeziehung auf der Ebene der GABA und des Benzodiazepin-Rezeptors zu der Verstärkung der GABA-ergen Inhibition kommt. Die zwei wichtigsten Arbeitshypothesen postulieren folgende Mechanismen:

1. Ein Protein, GABA-Modulin interferiert mit der Bindung von Benzodiazepinen an den Rezeptor und wandelt den GABA-Rezeptor von einer Konformationslage mit hoher Affinität in eine mit niedriger Affinität um. Damit sind in Gegenwart eines Benzodiazepins mehr GABA-Rezeptoren in der hochaffinen Konformation vorhanden, die relative Besetzung des GABA-Rezeptors mit GABA nimmt zu, der GABA-erger Impuls ist damit verstärkt (Costa 1979).
2. Die andere Hypothese geht davon aus, daß die Bindung eines Benzodiazepins an den Rezeptor den Effekt von GABA auf die Chloridleitfähigkeit der neuronalen Membran und damit auf die Hyperpolarisation über einen allosterischen Mechanismus verstärkt, ohne daß die Benzodiazepine selbst die Chloridleitfähigkeit erhöhen (Braestrup 1980) .

Nach neueren Publikationen soll der funktionelle Komplex zwischen GABA- und Benzodiazepin-Rezeptoren und dem Chloridkanal in der neuronalen Membran nicht nur den Angriffspunkt für die Benzodiazepine darstellen, sondern auch verschiedene andere ZNS-erregende oder dämpfende Pharmaka sollen über eine Beeinflussung dieses Systems ihre Wirkung entfalten (Olsen 1981, Paul 1981).

Interessanterweise sollen die Barbiturate in hypnotischen oder anästhetischen Dosen über eine Bindung an eine spezifische Stelle, den Pikrotoxin-Rezeptor, direkt die Chloridleitfähigkeit der neuronalen Membran erhöhen und somit selbst zu einer Hyperpolarisation führen (Olsen 1981, Paul 1981). Das steht im Gegensatz zu den Benzodiazepinen, die alleine keine Änderung der Chloridleitfähigkeit bewirken. Neben diesem Mechanismus scheinen die Barbiturate in der Lage zu sein, ebenfalls über eine Bindung an die Pikrotoxinbindungsstelle, den GABA-Rezeptor und den Benzodiazepin-Rezeptor so zu beeinflussen, daß die Bindung von Liganden an beide Rezeptoren verstärkt ist (Müller 1982).

Interessant ist auch, daß außer den Rezeptoren in ZNS auch in der Niere, Lunge, Leber und im Herzen benzodiazepin-spezifische Bindungsstellen nachgewiesen wurden.

Sie haben andere K_D - Werte und unterscheiden sich offensichtlich von den Rezeptoren in ZNS (Tietgen 1984). Ob diese "peripheren" - nichtneuronalen Bindungsstellen pharmakologische Bedeutung besitzen, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Welche der vier Eigenschaften der Wirkung von Benzodiazepinen: die sedative, antikonvulsive, anxiolytische oder muskelrelaxierende im Vordergrund steht, hängt teilweise von der Affinität zu den Benzodiazepin-Rezeptoren und von der Pharmakokinetik ab (Oelschlager 1982). Alle Benzodiazepine sind stark lipophil. Nach oraler Gabe werden sie schnell aus dem Dunndarm resorbiert. Sie sind stark an Plasmaproteine gebunden, ihre Eiweißbindung liegt zwischen 80 und 98%, was bei der Medikation sehr junger, älterer und kranker Menschen zu berücksichtigen ist, die gegenüber der Norm, verschobene Proteinbindung aufweisen. Eine verringerte Proteinbindung bedeutet eine erhöhte Toxizität. Bei einer Multimedikation ist eine Verdrängung aus der Eiweißbindung durch andere Pharmaka zu beachten. Ein hochprotein-gebundenes Pharmakon kann selbst körpereigene Stoffe aus der Eiweißbindung verdrängen, und diese können dann eine schädigende Wirkung auf den Organismus ausüben (Ochs 1982).

Die meisten Benzodiazepine haben, wie das Desmethyldiazepam, eine hohe Bioverfügbarkeit. Für oral verabreichtes Oxazepam wird sie mit 100% angenommen (Greenblatt 1980, Ochs 1982).

Im therapeutischen Bereich sind die Blutspiegel sehr niedrig, so z.B. der des Diazepams und seiner Metaboliten nur 0,02 bis 0,5 µg/ml. (Forth 1983).

Abgebaut werden die Benzodiazepine hauptsächlich von Leberenzymen. Die wichtigsten Reaktionen der Biotransformation sind Desalkylierungen an N-1, Hydroxilierungen am C-3u, Glukuronidierungen. Da die langwirkenden Benzodiazepine (z.B. Diazepam HWZ etwa 33 h) leicht kumulieren und fast immer aktive Metabolite haben (so hat z.B. Diazepam 3 aktive Metabolite, die eigenständige Pharmaka wurden: N-Desmethyldiazepam, Oxazepam und Temazepam), ist ihre Wirkung nur schwer zu steuern. So kann man z.B. bei chronischer Gabe des Diazepams dessen Wirkung zu etwa 50% dem Metaboliten N-Desmethyldiazepam (HWZ 53 h) zuschreiben.

Die mittellang wirkenden Substanzen haben kaum aktive Metabolite (z.B. Oxazepam mit HWZ von 4 - 15h). Um besser steuern zu können, sollten in Zukunft vorwiegend Benzodiazepine mit kurzen Halbwertszeiten, geringer Biotransformationsrate (stop Metabolism) und inaktiven Metaboliten eingesetzt werden (Moebius 1981).

Bei hoher Affinität zu den Benzodiazepin-Rezeptoren sind bereits Dosen um 250 - 500 µg effektiv. Ein Präparat, das diesen Anforderungen zum Teil genügt, ist das Triazolam, mit einer HWZ von 2,7 (Prous 1970, Oelschläger 1982).

Vor einer Überbewertung der Halbwertszeiten wird aber im allgemeinen gewarnt, da häufig keine Korrelation zu der Wirkungsdauer herzustellen ist. Benzodiazepine mit unterschiedlichen Halbwertszeiten können gleiche Resorptionsraten und gleiche klinische Wirkungen besitzen. Die Plasmaspiegel geben keine zuverlässige Information über das Ausmaß der ZNS-Wirkung, da psychotrope Effekte mit der Ausscheidung aus dem Plasma nicht beendet sind. Trotzdem, im allgemeinen, Substanzen mit langer Halbwertszeit beeinträchtigen die Leistungsfähigkeit stärker, auch "Hangover-Symptome" sind häufiger (Rickels 1982).

Bei der Standardtherapie, vor allem ambulanter Patienten, sollten Benzodiazepine verwendet werden, die eine relativ kurze Halbwertszeit haben und nicht in wirksame, langsam eliminierbare Metabolite umgewandelt werden (Wellhöner 1982).

Zu den unerwünschten Nebenwirkungen der Benzodiazepine gehören: Ataxie, Müdigkeit, Konzentrationsverlust, verlängerte Reaktionszeiten, z.T. erhebliche Gewichtszunahme, Gewichtsabnahme, Obstipation, Schwindel und Menstruationsstörungen (Gerlach 1985).

Häufige Nebenwirkungen der Benzodiazepine sind eine Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit und Katersymptome. Sie sind stärker und halten länger an bei Verbindungen mit langen Halbwertszeiten und bei hohen Dosierungen (Zitmann 1982).

Es wurde z.B. für die Benzodiazepine Flunitrazepam, Flurazepam und Triazolam nachgewiesen, daß sie noch 10 - 12 Stunden nach Einnahme einer hypnotisch wirkenden Dosis die mit psychologischen Tests ermittelte Leistungsfähigkeit beeinträchtigen (Bond 1973, Bond 1975, Veldkamp 1974).

Ebenso wurden ausgeprägte Nachwirkungen von Benzodiazepinen auf das Schlaf EEG nachgewiesen (Borbély 1982). Diese persistierenden EEG-Veränderungen in der Schlafperiode, die 24 Stunden nach Einnahme vom Medikament begann, sind z.T. auf einen Residualspiegel der Pharmaka oder ihrer aktiven Metabolite im ZNS, z.T. auch auf nachhaltige Wirkung auf die physiologische Schlafregulation zurückzuführen (Borbély 1982).

Die kurzer wirkenden Verbindungen, wie z.B. das Triazolam, verändern nicht die Dauer des REM-Schlafes, lediglich der Eintritt des REM-Schlafes wird verzögert. Länger wirkende Präparate dagegen supprimieren sowohl den REM - als auch den Slow - wave - Schlaf (Roth 1982).

An Stelle der erwünschten psychovegetativen Entkopplung, die die Überleitung psychischer Affektionen auf das vegetative Nervensystem hemmt, kann zur Lösung von Angstzuständen, reine Gleichgültigkeit resultieren. Ferner wird durch Hemmung polysynaptischer spinaler Reflexe die motorische Leistung herabgesetzt. Es kann eine Ataxie resultieren. (Iversen 1980, Greenblatt 1974, Lader 1980, Wellhoner 1982, Mc Curdy 1980).

Bereits bei therapeutischer Dosierung kann die Fahrtüchtigkeit beeinflusst werden (Wuschichtigkeit, Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit, Störung motorischer Funktionen, Nachlassen kognitiver Fähigkeiten, Reduzierung der Selbstkontrolle) (Kuschinsky 1981).

Beim plotzlichen Entzug hoher Dosen von Benzodiazepinen kann es zu Krampfanfällen, häufiger aber auch nur zu Unruhe, Schlafstörungen und vegetativen Symptomen kommen (Gerlach 1985, Zitmann 1982). Dabei kann es sich um Reboundeffekte, um Entzugssymptom oder um ein Wiederaufflackern der ursprünglichen Symptomatik handeln (Kuschinsky 1981, Zitmann 1982).

Während einer langer dauernden Behandlung mit Benzodiazepinen kann sich eine Toleranz oder psychische Abhängigkeit entwickeln. Die Toleranz bildet sich besonders gegenüber dem sedativen und antikonvulsiven Effekt dieser Substanzklasse aus, weniger gegenüber der anxiolytischen Eigenschaft.

Eine Begründung für diese Tatsache hat die Erforschung der zellulären Mechanismen noch nicht bringen können (Iversen 1980).

Bereits bei Neugeborenen fanden sich Entzugerscheinungen. Ein besonderes Problem ist vielleicht der Metabolismus im ganz frühen Kindesalter. Bei unreifen Neugeborenen scheint z.B. Chlordiazepoxid verzögert ausgeschieden zu werden, so daß noch 2 - 3 Wochen nach der Geburt mit Entzugerscheinungen gerechnet werden muß (Clarmann 1982).

Bei intravenöser Applikation im Kindesalter kann es zu einer atem-depressiven Wirkung kommen. Hypersekretion und eine dadurch bedingte Verschleimung der Atemwege bei Säuglingen und Kleinkindern ist besonders bei Clonazepam beschrieben (Römer 1982).

Alte und herzlabile Patienten reagieren häufig stärker auf Benzodiazepine (Römer 1982). Besonders bei Zerebralsklerotikern, Kranken im reduziertem Allgemeinzustand und seltener bei Kindern können paradoxe Reaktionen in Form von Depressionen, Feindseligkeit, psychotischer Reaktion und Hyperaktivität (Unruhe, Verwirrtheit) auftreten (Zitmann 1982, Forth 1983, Römer 1982).

Im Bereich therapeutischer Dosen ist eine Wirkungsverstärkung durch den gleichzeitigen Alkoholkonsum zu verzeichnen (Römer 1982, Apelt 1982).

Es besteht auch eine Interaktion mit Antikoagulantien (z.B. Phenprocumon und Chlordiazepoxid, Diazepam, Nitrazepam) (Kinaw 1976).

Angaben über die Analysemöglichkeiten der Benzodiazepine sind z.B. in den Arbeiten von Schütz zu finden (Schütz 1978, 1980, 1982, 1983).

1.5. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode

1.5.1. Vorteile

Methoden, die zum Nachweis von Pharmaka in Körperflüssigkeiten führen und die gesuchten Substanzen bis zu Bruchteilen eines Mikrogrammes erfassen, sind: die Papierchromatographie, die Dunnschichtchromatographie, die Gaschromatographie, die Polarographie, die Spektrophotometrie, die Markierung mit radioaktiven Isotopen sowie die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie hat die Toxikologie eine Methode zur Hand, die den nach Schmidt (1969) folgenden Voraussetzungen für eine toxikologische Analyse in hinreichendem Maße nahekommt:

- hohe Empfindlichkeit
- große Spezifität
- geringe Storanfälligkeit
- ökonomischer Arbeitsaufwand
- Dokumentation der Ergebnisse

Vor allem folgende Aspekte der HPLC-Methode sind für die Anwendung dieses Verfahrens für den Nachweis von pharmakologischen Grundsubstanzen und deren Metaboliten in der Toxikologie verantwortlich:

- relative Einfachheit der Probenaufbereitung
- relativ kleine Mengen an benötigten Proben
- Wiederverwendbarkeit der Proben und somit auch Wiederholbarkeit der Analysen bei gleichen oder bei geänderten Bedingungen
- Möglichkeit der gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Bestimmung von mehreren Substanzen und pharmakologisch aktiven Metaboliten
- Programmierbarkeit vieler Abläufe, Änderungen und Bedingungen und somit Zeitersparnis und Wirtschaftlichkeit
- Genauigkeit, Wiederholbarkeit d.h. Überprüfbarkeit der Ergebnisse (Vree 1981, Schwedt 1983, Dark 1973).

Außerdem sind mit der HPLC auch Reinheitsüberprüfungen möglich (Elgass 1982) - d.h. man kann mit der HPLC einzelne Substanzen auf das Vorhandensein von Unreinheiten untersuchen (Dark 1973).

Darüber hinaus kann die HPLC noch wertvolle Hinweise auf die Struktur unbekannter Wirkstoffe oder mögliche Zersetzungsprodukte liefern (Rehm 1981).

1.5.2. Grundbegriffe

Die grundlegenden theoretischen Erkenntnisse der Gas-Chromatographie aus den sechziger Jahren, die mit zur Kapillar-Gas-Chromatographie geführt haben, zeigen auch für die Flüssigkeits-Chromatographie die Zusammenhänge zwischen hoher Trennleistung und physikalisch-chemischen Parametern (Schwedt 1983).

Mit der Verwendung von Trennmaterialeien (Packungsteilchen) sehr geringer Durchmesser (unter $40\text{ }\mu\text{m}$) in dünnen Säulen (mit inneren Durchmessern unter 5 mm) sind flüssigkeits-chromatographische Trennungen von zwanzig und mehr Stoffen in weniger als einer halben Stunde möglich geworden. Bedingt durch die geringen Teilchendurchmesser (und dem damit hohen Stromungswiderstand in der Säule) sind für Durchflußraten im Milliliter-Bereich je Minute - im Gegensatz zur klassischen Säulen-Chromatographie mit Teilchengrößen über $100\text{ }\mu\text{m}$ - hohe Drücke erforderlich geworden, die am Anfang der technologischen Entwicklungen nicht selten bis in den Bereich von mehr als 300 bar reichten. Daher stammt auch die ursprüngliche Bezeichnung " high-pressure-liquid-chromatography " (HPLC, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie). Mit den Verbesserungen in der Herstellung von Trennmaterialeien sind die Arbeitsdrücke heute erheblich gesunken, sodaß Bezeichnungen wie "high performance" oder "high speed liquid chromatography" (Hochleistungs-oder schnelle Flüssigkeits-Chromatographie, HSLC) diese chromatographische Analysetechnik weitaus treffender charakterisieren. Die wesentlichsten Merkmale der HPLC sind kleine Teilchendurchmesser der Trennmaterialeien, hohe Trennleistungen, kurze Analysezeiten, qualitative und quantitative Analysen mit empfindlichen und selektiven Durchflußdetektoren im On-line-Betrieb und damit eine im Vergleich zur klassischen Säulen-Chromatographie apparativ anspruchsvolle Analysetechnik (Schwedt 1983). Ein HPLC-Gerät besteht im Grundaufbau aus einer Hochdruckpumpe zur Förderung der mobilen Phase, einem Probenaufgabensystem, einer Trennsäule, die über eine Kapillare mit einem Durchflußdetektor verbunden ist, sowie dem zur qualitativen und quantitativen Analyse erforderlichen Schreiber oder elektronischen Integrator.

Aufgrund dieses Geräteaufbaues laufen die Einzelschritte einer chromatographischen Analyse-Probenaufgabe, Trennung, Überführung in das Detektionssystem und quantitative Auswertung - automatisch ab. Mit Hilfe einer zweiten Hochdruckpumpe und einer speziellen Programmiereinheit lassen sich Gradientelutionen mit veränderter Zusammensetzung der mobilen Phase durchführen. (Die Gradientenbildung ist auch ohne zweite Hochdruckpumpe auf der sogenannten Niederdruckseite vor der eigentlichen Hochdruckförderpumpe möglich) (Schwedt 1983).

Auch ein weiterer Teilschritt eines vollständigen Analyseverfahrens, die Probenvorbereitung (das "clean-up"), läßt sich heute bereits automatisch durch die Kombination mehrerer Säulen (als multidimensionale Technik) durchführen (Apffel 1981). Im Hinblick auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Trennungen zur qualitativen Analyse über die Retentionszeiten und auf die quantitative Analyse (Auswertung der Bandenflächen oder auch -höhen) werden hohe Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der einzelnen Einrichtungen gestellt.

Die Hochdruckpumpe hat mit hoher Präzision für eine konstante und pulsationsfreie Stromung zu sorgen, damit aufgrund der Retentionsvolumina (bzw. -zeiten) eine zuverlässige qualitative und ohne Beeinflussung der Detektoreigenschaften durch Pulsation (bemerkbar im Rauschen des Detektorsignals) empfindliche quantitative Analyse möglich ist. Die Förderleistungen der Pumpe liegen in der Regel zwischen 0,1 und 10 ml/min. (Schwedt 1983).

In den Anfängen der HPLC wurden Gradientensysteme mit kommunizierenden Gefäßen realisiert, heute bemüht man programmierbare Gradientenformer, die, je nach bestimmten Kriterien als Hochdruckgradientenformer (HDG), Niederdruckgradientenformer (NDG), Niederdruckdosiergradientenformer (NDDG) sowie binäre, ternäre, quaternäre Gradientensysteme benannt werden.

Alle Gradientensysteme haben den Zweck, entweder Lösungsmittel isokratisch zu mischen - wobei es leicht möglich ist, das Mischungsverhältnis der Lösungsmittel dem jeweiligen Analyseproblem anzupassen - oder es wird ein zeitabhängiger Wechsel des Lösungsmittelgemisches erzeugt, um die Elutionskraft während einer Analyse derart zu steigern, daß die zu trennenden Substanzen bestmöglich unterschieden werden.

Im wesentlichen sind es fünf Hauptanforderungen, die ein modernes Gradientenformersystem erfüllen muß:

- exaktes Erzeugen eines vorgegebenen Mischungsverhältnisses
- konstantes Mischungsverhältnis
- kurze Ansprechzeit bei vorgegebener Änderung des Mischungsverhältnisses
- konstante Flußrate
- leichte Bedienbarkeit.

Sollwertgetreue Mischungsverhältnisse ermöglichen die Ausarbeitung von Trennvorschriften und die Übertragbarkeit der Flußrate.

Die Datenauswertung mittels Flächenintegration der Peaks ist besonders problematisch, da die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit durch den kombinierten Einfluß von Forderkonstanz der Pumpe und Welligkeit des Mischungsverhältnisses bestimmt wird. Auch wenn die Fläche eines letzten auszuwertenden Peaks durchschnittlich gute Reproduzierbarkeit zeigt, wird man immer wieder größere Abweichungen im Mittelfeld des Gradientenchromatogramms finden. Das bedeutet, daß selbst die Einführung eines internen oder externen Standards immer wieder relativ große Abweichungen von typischen 1% bis 4% der Meßwerte ergibt. Mit dem NDDG-System sollte eine Reproduzierbarkeit von vergleichsweise 0,3% bis 1,5% erreicht werden können (Riggemann 1982).

Im Detektor muß, ebenso wie im Probenaufgabesystem, für eine geringstmögliche Dispersion gesorgt werden. Diese Forderung kann durch ein kleines Zellvolumen der Durchflußkuvette (8-20 μ l) weitgehend erfüllt werden, die Verbindung mit der Trennsäule muß wiederum totvolumenarm über Kapillarkupplungsteile erfolgen, die Durchflußzellen müssen über eine Druckkonstanz im Bereich von etwa 10bar verfügen (Schwedt 1983).

Zu der breiten Anwendung der HPLC- Analysemethodik haben unter anderem die vielseitigen Detektionsmöglichkeiten beigetragen. Zu den Detektoren, bzw. Detektionsmethoden, die bisher in Online-Verbindung mit der HPLC schon mit Erfolg eingesetzt wurden, zählen:

- Molekulspektroskopische Detektoren (VV/VIS-Spektralphotometer, Fluorimeter, Differential-Refraktometer, Infrarot-Spektralphotometer, Massenspektrometer, Kernresonanzspektrometer);
- Elektrometrische bzw. chemische Detektoren (Konduktometer und Potentiometer, Polarograph, Kapazitätsdetektor);

- Atomspektroskopische Detektoren (Atomabsorptions-Spektralphotometer, Flammenphotometer, Emissionsspektralphotometer mit Plasma-lichtquelle);
- Spezielle Detektoren und Detektionssysteme (Radioaktivitätsdetektor, Transportdetektor, chemische Reaktionsdetektoren) (Schwedt 1983).

In der HPLC kommt neben dem Detektor, bzw. dem Detektionssystem, der Trennsäule eine besonders große Bedeutung zu.

Die Trennsäulen bestehen aus einem Säulenmaterial und der Füllung an Trennmateriäl.

Als Säulenmantel werden überwiegend Edelstahlrohre, aber auch Glasrohre in speziell druckstabiler Ummantelung (geeignet bis 200bar Eingangsdruck) mit inneren Durchmessern zwischen 2 und 5 mm und in den letzten Jahren auch Quarzkapillare ("micro-bore-columns") eingesetzt (Takeuchi 1981) .

Die theoretische Trennstufenhöhe gehört zu den allgemeinen theoretischen Grundbegriffen in der chromatographischen Analytik. Sie wird im theoretischen Trennstufenmodell als der Abschnitt einer chromatographischen Trennsäule (oder Trennstrecke), in der sich die Verteilung eines Stoffes zwischen stationärer u. mobiler Phase im Gleichgewichtszustand befindet, definiert (entsprechend dem Modell der Böden in einer Destillationskolonne) (Eppert 1979, Knox 1977). Eine entscheidende Erniedrigung der Trennstufenhöhe ist durch eine Verringerung des Teilchendurchmessers zu erreichen (Schwedt 1983, Krebs 1983). Da aber bei Durchmessern unter 5µm der Druck in der Säule ganz erheblich zunimmt, so daß wiederum andere, die Trennstufenhöhe negativ beeinflussende Effekte (z.B. Temperatureffekte, Instabilität der Trennmateriälien) auftreten können, werden heute Säulenpackungsmateriälien von 3 bis 5µm Durchmesser verwendet (Schwedt 1983, Krebs 1983).

Alle Trennmateriälien für die HPLC müssen druckstabil sein, die Siebfraktion soll möglichst eng sein, um Störungen im chromatographischen System durch Verstopfen und damit hohen Druckabfall sowie unerwünschte Dispersionseffekte zu vermeiden (Schwedt 1983).

Druckstabile Teilchen lassen sich in Form vollkommen poröser Materialien oder als Dunnschichtteilchen ("porous layer beds" PLB) realisieren. Mehr als die Hälfte aller publizierten Trennungen in HPLC beruhen heute auf der Verwendung apolarer, sogenannter "Reversed-phase"-Materialien. Das Prinzip der Reversed-phase-Chromatographie ist bereits aus der Papier- und Dunnschicht-Chromatographie bekannt: Ein polares Trennmateriel (Cellulose oder Kieselgel) wird durch Abdeckung der polaren Stellen (hier mit Silicon- oder anderen Ölen) in ein apolares umgewandelt, die in der Absorptions-Chromatographie (an Kieselgel) apolare mobile Phase wird zu einer polaren aus Gemischen mit Wasser. Für die HPLC-Trennungen werden chemisch-modifizierte Trägermaterialien hergestellt: die aktiven Gruppen aus Kieselgel werden durch Umsetzung mit Halogenalkylsilanen chemisch gebunden. Die chemisch gebundenen organischen Reste (Ethan - bis Octadecanketten C_2 bis C_{18} bzw. RP-2 bis RP-18) bilden eine quasi-monomere Schicht auf dem Kieselgel, wobei die Moleküllängsachsen sich senkrecht in Form von "Brücken" auf der Oberfläche anordnen (Schwedt 1983). Solche Phasen weisen eine hohe Stabilität auf und ermöglichen mit einfach zusammengesetzten mobilen Phasen aus Wasser und damit mischbaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Acetonitril, Trennungen unpolarer bis polarer Stoffe (Horvarth 1977). Weisen die chemisch gebundenen Phasen funktionelle Gruppen wie Nitro-Cyano- oder Dimethylamino-Gruppen auf, so lassen sich selektive Trenneffekte auch mit organischen Lösungsmitteln als Elutionsmittel erreichen. Die Einfachheit und sehr gute Reproduzierbarkeit reversed-phase-chromatographischer Trennungen haben dieser Trennmethode einen hohen Stellenwert für den gesamten Bereich chemischer Stoffe verschafft. Solche Systeme bieten für sehr polare, dissoziierbare Stoffe weitere Trennmöglichkeiten durch die Bindung von Ionenpaaren: In der mobilen Phase wird ein entgegengesetzt geladenes (Gegen-) Ion mit länger apolarer Kette gelöst, welches zusammen mit den zu trennenden Stoffen ein ungeladenes Ionenpaar mit neuen chromatographischen Eigenschaften bildet. Auf diese Weise werden oft ideale Trennbedingungen für polare Stoffe in Gemischen mit weniger oder sogar unpolaren Stoffen bereits in isokratischen Systemen (d.h. ohne Gradientelution) erreicht.

Weitere chromatographische Trennmethode, wie Ionenaustausch und Gelpermeations - (Ausschuß -) Chromatographie haben durch die Herstellung geeigneter Materialien ebenfalls in den letzten Jahren Eingang in die HPLC gefunden und eröffnen somit Trennmöglichkeiten über die ganze Breite chemischer Stoffe von den Makromolekülen über polare niedermolekulare Stoffe bis zu den Ionen (Schwedt 1983).

Die Auswertung durch die Messung der unterschiedlichsten Stoffeigenschaften aus den Elutionskurven (Messungen von Signalhöhen- und-flächen sowie von Retentionszeiten) erfolgt in der Regel über die Aufzeichnungen eines Kompensationsschreibers und zusätzlich mit Hilfe elektronischer Integratoren, die außerdem noch mit weiteren Datenerfassungs-und Speichergeräten verbunden sein können (Schwedt 1983).

Die stürmische Weiterentwicklung der Elektronik in den letzten Jahren hat selbstverständlich auch die Automatisierung der HPLC stark beeinflusst.

Ausgehend von völlig manueller Bedienung mit dem Zwang zur andauernden Überwachung durch den Benutzer wurden die Komponenten der HPLC nach und nach verbessert und automatisiert (Iwertowski 1983).

Etwa 1977 wurden vollautomatische Kompaktsysteme zur HPLC-Methoden-Entwicklung vorgestellt (Illwrick 1977).

2. Untersuchungsergebnisse

2.1. Verlauf der Untersuchungen

Zuerst wurden die Standard-Lösungen einzelner Substanzen hergestellt. Diese wurden dann mit der HPLC untersucht.

Dabei wurden die Bedingungen (Temperatur, Wellenlänge, Mischverhältnis usw.) so lange geändert, bis eine Trennung, Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen möglich war.

Anschließend wurden die Standard-Blutproben hergestellt und die ausgearbeitete Methodik an diesen angewendet. Mit der Anwendung der Methode an einigen Blutproben aus der taglichen Praxis des Institutes der Gerichtsmedizin und mit dem Vergleich der mit der HPLC und anderen chromatographischen Methoden erhaltenen Ergebnissen wurden die Untersuchungen abgeschlossen.

2.2. Optimierung der Untersuchungsbedingungen

2.2.1 Gerät

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden durchgeführt mit dem:

Hewlett-Packard 1084B Liquid Chromatograph

mit:

- Variabler Wellenlänge Detektor 79875A
- UV Detektor 79870A
- Variabler Volumen Injektor 79841A
- 79850A LC Terminal.

2.2.2. Säule

Es wurde zuerst mit einer Riedel de Haën $10 \mu \text{C}_{18}$ Glassäule von 300 mm, später mit einer MN Nucleosil $5 \mu \text{C}_{18}$ Stahlsäule mit Vorsäule von 125 mm gearbeitet, für die dann auch die Untersuchungsbedingungen optimiert wurden.

Wenn sonst alle anderen Bedingungen exakt gleich waren, wurden je nach Säulenart, unterschiedliche Retentionszeiten erzielt. Und zwar waren die Retentionszeiten bei der Verwendung der Riedel de Haën $^{10} \text{C}_{18}$ Glassäule höher als die, welche bei der Verwendung der MN Nucleosil $^5 \text{C}_{18}$ 125 mm Stahlsäule erhalten wurden.

Der K' -Wert, definiert als: Retentionszeit der Substanz

Retentionszeit des Lösungsmittels

blieb aber - im Bereich von Standardabweichungen - gleich.

Es ist also wichtig, immer die gleiche Säulenart zu benutzen, oder aber die Ergebnisse müssen auf eine Säulenart neu bestimmt werden.

Im weiteren, falls nicht ausdrücklich anders bemerkt, handelt es sich in unseren Beispielen um eine MN Nucleosil $^5 \text{C}_{18}$ Stahlsäule von 125 mm mit Vorsäule

Änderung der Retentionszeiten in Abhängigkeit von der Säulenart

Standardlösungen von Bromazepam: 1 mg

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 57

Wellenlänge : 235/600 nm

Abschwächung : 2^5

Flussrate : 1 ml / min

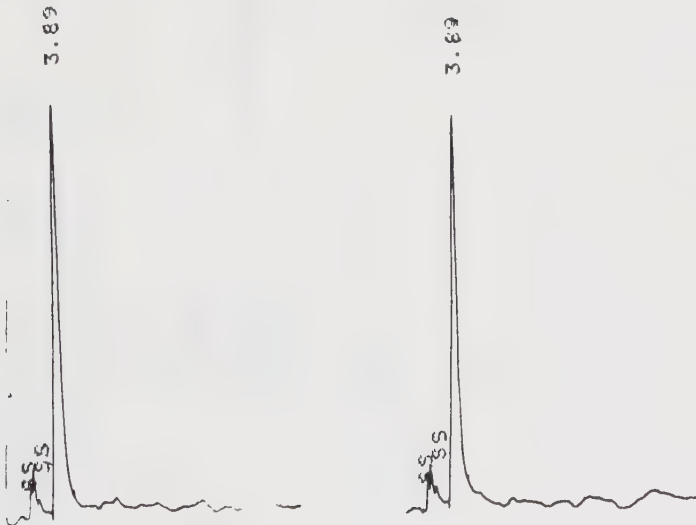


Abb. 1 a)

Riedel de Haën $^{10}C_{18}$ Glassäule von 300 mm

Retentionszeit: 3,89

K' - Wert : 2,08

Fläche : 61601

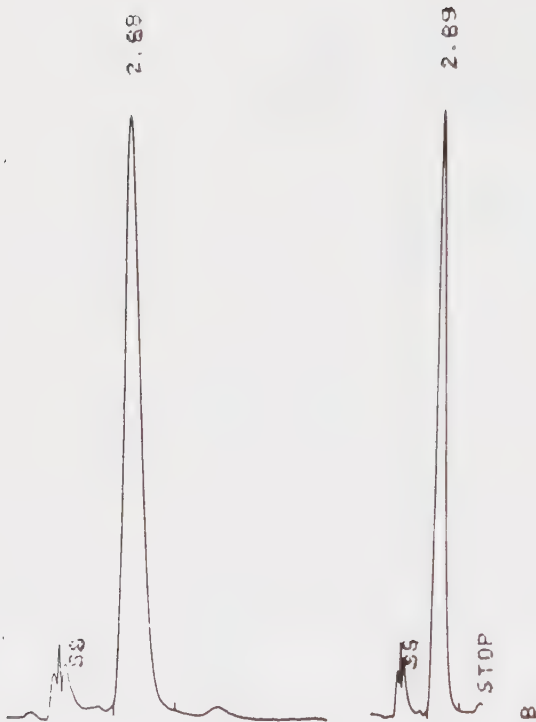


Abb. 1 b)

MN Nucleosil $^5C_{18}$ Stahlsäule von 125 mm

Retentionszeit : 2,89

K' - Wert : 2,04

Fläche : 55500

Tabelle 1 :

Beispiele für die Änderung der Retentionszeiten mit der Änderung der Säulenart

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 57

Wellenlänge : 235 / 600

Abschwächung : 2^5

Flussrate : 1 ml / min

Säule :	Riedel de Haën	MN Nucleosil
	$^{10}\text{C}_{18}$ Glas 300mm	$^5\text{C}_{12}$ Stahl 125mm
	Retentionszeiten:	
1. Flurazepam	3,04	2,35
2. Oxazolam	3,65	2,76
3. Bromazepam	3,89	2,89
4. Medazepam	4,19	2,93
5. Clonazepam	4,21	3,17
6. Nitrazepam	4,30	3,20
7. Chlordiazepoxid	4,65	3,30
8. Flunitrapezam	4,75	3,41
9. Clobazam	4,82	3,59
10. Lorazepam	4,86	3,73
11. Oxazepam	5,00	3,75
12. Triazolam	5,99	4,13
13. Temazepam	6,10	4,43
14. Lormetazepam	6,76	4,61
15. Dikaliumchlorazepat	7,08	5,17
16. Matezolam	9,17	6,44
17. Diazepam	9,45	6,50
18. Clotiazepam	11,02	7,83
19. Camazepam	11,34	8,01
20. Prazepam	18,54	11,74

Wie es auch Kiedmann (1983) erwähnt, wurde festgestellt, daß außer der Verkürzung der Analysedauer - also außer der Zeitersparnis - diese kürzere Säule noch weitere Vorteile bietet:

- Es wird weniger Lösungsmittel verbraucht:
das Gerät wird ökonomischer für Routinearbeiten.
- Die Peaks eluieren weniger verdünnt:
die Empfindlichkeit (untere Nachweisgrenze) wird erhöht, oder es kann bei gleicher Empfindlichkeit das Dosiervolumen erhöht werden. Dies ist von Bedeutung, wenn nur geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen.
- Die Auflösung bleibt die gleiche wie bei der längeren Säule.

2.2.3. Temperatur

Es wurde mit einer konstanten Ofen - Temperatur von 40°C gearbeitet.

Die Versuche zeigten, daß die Änderung der Ofen - Temperatur wesentlich die Ergebnisse der Analysen beeinflussen kann.

Die Temperatur beeinflusst nicht nur die Retentionszeiten - also auch die Analysezeiten - sondern, wie es auch Riedmann (1983) feststellt, auch die Selektivität und die Effizienz der Säule.

Temperatur - Änderung

Standardlösung von Pentobarbital : 1 mg %ig

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 45

Wellenlänge : 220 / 600 nm

Flußrate : 1 ml / min

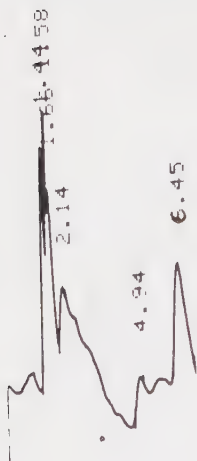


Abb. 2 a)

Ofentemperatur: 30° C

Retentionszeit : 6,45

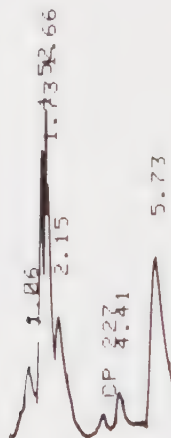


Abb. 2 b)

Ofentemperatur : 40° C

Retentionszeit: 5,73

2.2.4. Abschwächung und Einspritzvolumen

Das verwendete Gerät hatte einen automatischen Probengeber mit einstellbarem Einspritzvolumen.

Bei gewählten Bedingungen wurde als optimales Einspritzvolumen und optimale Abschwächung festgelegt :

Für die Einspritzung von 10 μ l reicht die Abschwächung von 2^5
Für die Einspritzung von 20 μ l wurde die Abschwächung 2^6 gewählt

Für Substanzen, für die diese Angaben nicht ausreichten, wurden die Parameter entsprechend geändert.

Die folgenden Graphen zeigen die Änderung der Peak - Form in der Abhängigkeit von der Änderung des Einspritzvolumens und der Abschwächung.

Änderung der Spitzen - Form mit der Änderung der Abschwächung
und Einspritzvolumen

Säule : MN Nucleosil C_{18} Stahlsäule 125 mm

Standardlösungen von Bromazepam 1 mg %ig

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 57

Wellenlänge : 235 / 600 nm

Flussrate : 1 ml / min



Abb. 3 a)

Abschwächung: 2^5

Einspritzvolumen : 10 μ l

Abb. 3 b)

Abschwächung : 2^5

Einspritzvolumen : 20 μ l



Abb. 3 c)

Abschwächung : 2^6

Einspritzvolumen : 10 μ l



Abb. 3 d)

Abschwächung : 2^6

Einspritzvolumen : 20 μ l

2.2.5. Automatische Programmänderung oder Elimination der Störspitzen durch Änderung der Steigung der Grundlinien

Die Störspitzen, die vor allem in den ersten Minuten auftreten, sind verursacht durch Absorption der Lösungsmittel, Elutionsmittel, Puffer, Gummikappchen, Spritzfläschchen und durch Unreinheiten.

Um die Störspitzen möglichst klein zu halten, empfiehlt sich .

- die Verwendung von reinen Reagenzien
- Änderung des Programms : Änderung der Steigung der Grundlinien in den ersten 1,70 Minuten : Steigungsempfindlichkeit : 81,00
danach Änderung auf : Steigungsempfindlichkeit : 0,20

Die Zeit von 1,70 Minuten wurde gewählt, da in der Zeit von 1,90 Minuten die Spitzen der ersten untersuchten Substanzen (7 - Amino-derivat von Flunitrazepam und Coffein) auftreten.

Eliminierung der Störspitzen :

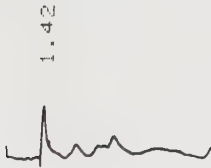


Abb. 4 a)

Ethanol

Abschwächung : 2^5

Steigungsempfindlichkeit: 0,20

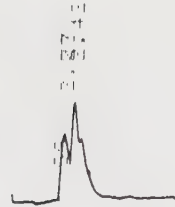


Abb. 4 b)

Äther/Äthylacetat-eingedämpft
in Methanol aufgenommen

Abschwächung : 2^5

Steigungsempfindlichkeit: 81

Nach 1,80 Min. Änderung der

Steigungsempf. auf: 0,20



Abb. 5 a)

Glasfläschchen mit

Ethanol

ohne Gummikappe

Abschwächung: 2^3

Steigungsempf.: 0,20



Abb. 5 b)

Glasfläschchen mit

Ethanol

mit Gummikappe

Abschwächung: 2^3

Steigungsempf.: 0,20



Abb. 5 c)

Glasfläschchen mit

Ethanol

m. Paraffinverschluß

Abschwächung: 2^3

Steigungsempf.: 0,20

2.2.6. Wellenlänge

Mit der Wahl der Wellenlänge werden die Detektionsempfindlichkeit, die Detektionsselektivität und die Linearität optimierbar (Riedmann 1983).

Weil die untersuchten Substanzen in verschiedenen Wellenlängen-Bereichen ihre Absorptionsmaxima haben, war es notwendig, alle untersuchten Substanzen zuerst auf ihr Absorptions-Verhalten zu untersuchen, also die Absorptionsspektren aller Substanzen mittels "scanning", d.h. mechanischem Abfahren des Wellenlängenbereiches aufzunehmen.

Es wurde also mit dem Absuchungs-Programm das UV-Spektrum von jedem Arzneistoff einzeln festgestellt : Die Standard - Proben wurden injiziert , der Fluß wurde angehalten beim Maximum von jeder Spritze und das UV - Spektrum wurde für jede Substanz abgesucht (Bente 1982).

Die optimale Wellenlänge war auch von der Wahl der Elutionsmittel und vom Mischverhältnis dieser abhängig.



Abb. 6 a)
Cyklopentobarbital



Abb. 6 b)
Phenobarbital



Abb. 6 c)

Diazepam

Abb. 6 d)

Oxazepam

2.2.7. Elutionsmittel

Nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Elutionsmitteln wählten wir für unsere Blutproben folgende Lösungen und Mischverhältnisse:

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

Elutionsmittel B : Methanol

Mischverhältnis:

- für die Barbiturate : 45 % B

- für die Benzodiazepine : 57 % B

eventuell auch : 45 % B

Der Phosphat-Puffer wurde nach folgender Vorschrift hergestellt :

3 g KH_2PO_4 wurden in 2 l H_2O gelöst

Anschließend wird mit H_3PO_4 der pH-Wert 2,3 eingestellt

Es ist sehr wichtig, daß der pH-Wert vom Phosphat-Puffer exakt auf 2,3 eingestellt ist, da sonst wesentliche Änderungen der Auswertungen (Retentionszeiten usw.) auftreten.

Da, wie es auch Spatz (1981) ausführlich diskutiert, die in Elutionsmitteln gelösten Gase eine erhöhte UV-Absorption und eine Lösung von Fluoreszenzsignalen zur Folge haben können oder sauerstoffempfindliche Probenkomponente angreifen können, wurden alle Elutionsmittel vor der Anwendung mit Helium entgast.

Der geringe apparative Aufwand und die geringen Kosten dieser kontinuierlichen Entgasungsmethode ist besonders im Vergleich mit anderen Methoden wie z.B. Erhitzen der Lösungsmittel oder Ultraschall - Anwendung (Iwertowski 1983) vorteilhaft.

2.2.8. Elutionsmittel und Wellenlänge

Unter sonst exakt gleichen Bedingungen änderten wir die Elutionsmittel und die Wellenlänge.

1. Elutionsmittel A : H_2O
Elutionsmittel B : Methanol
%B (Anteil des Elutionsmittels B) : 45 %
Wellenlänge 220 / 600 nm

Bei diesen Bedingungen konnten fast alle untersuchten Substanzen nachgewiesen werden, außer : Oxazolam, Medazepam, Phenythoin u. Heptabarbital, die keine Peak-Spitze entwickelten und Prazepam, das sehr lange Retentionszeit hatte.

2. Elutionsmittel A : Phosphat-Puffer pH 2,3
Elutionsmittel B : Methanol
a) % B (Anteil des Elutionsmittels B) 57 %
Wellenlänge 235 / 600 nm

Diese Bedingungen erwiesen sich als optimal für alle Benzodiazepine aber nur für folgende weitere untersuchten Substanzen : Heptabarbital, Vinylbital, MPPH . Methaqualon, Methohexital.

- b) % B (Anteil des Elutionsmittels B) : 45 %
Wellenlänge 235 / 600 nm

Es waren ebenfalls optimale Bedingungen für den Nachweis von Benzodiazepinen.

Wellenlänge 220 / 600 nm

Diese Wellenlänge war bei gleichen Bedingungen für den Nachweis von Barbituraten optimal

Änderung des Elutionsmittel A , des Mischverhältnisses % B und
der Wellenlänge

Standardlösungen von Cyklopentobarbital 1 mg %ig

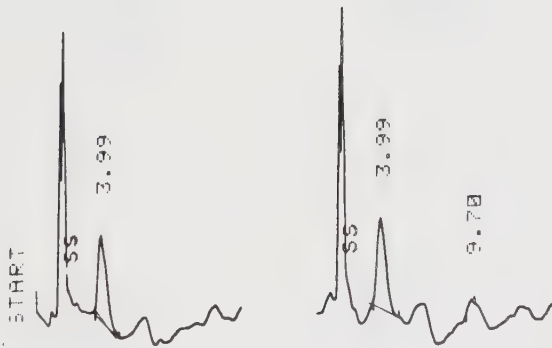


Abb. 7 a)

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 45

Wellenlänge 220 / 600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1 ml / min

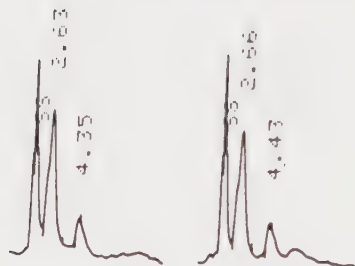


Abb. 7 b)

Elutiosnmittel A : Phosphat-Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

B : Methanol

Abschwächung 2⁶

%B : 45

Flußrate 1 ml / min



Abb. 7 c)

Elutiosnmittel A : H₂O

Wellenlänge 220/600 nm

B : Methanol

Abschwächung 2⁵

%B : 45

Flußrate 1 ml / min

Standardlösungen von Phenobarbital 1 mg %ig

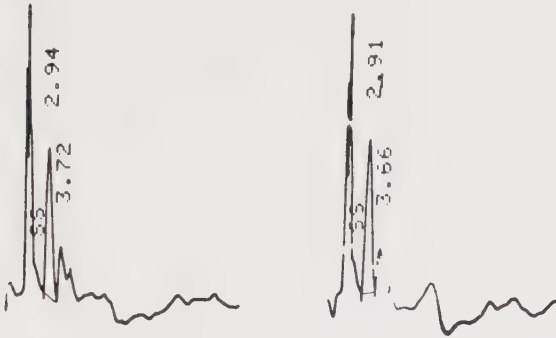


Abb. 8 a)

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 45

Wellenlänge 220/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1 ml / min



Abb. 8 b)

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 45

Wellenlänge 235/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1 ml / min

Standardlösungen von Oxazepam 1 mg %ig



Abb. 9 a)

Elutionsmittel

A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B: 57

Wellenlänge 235/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1 ml/min



Abb. 9 b)

Elutionsmittel

A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B: 45

Wellenlänge 235/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1,5 ml/min



Abb. 9 c)

Elutionsmittel

A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B: 45

Wellenlänge 220/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1,5 ml/min

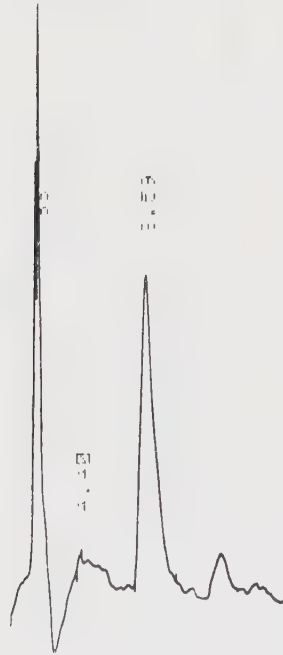


Abb. 9 d)

Elutionsmittel

A : H_2O

B : Methanol

%B: 45

Wellenlänge 220/600 nm

Abschwächung 2^5

Flußrate 1 ml/min

Vergleich der Retentionszeiten bei unterschiedlichen Bedingungen

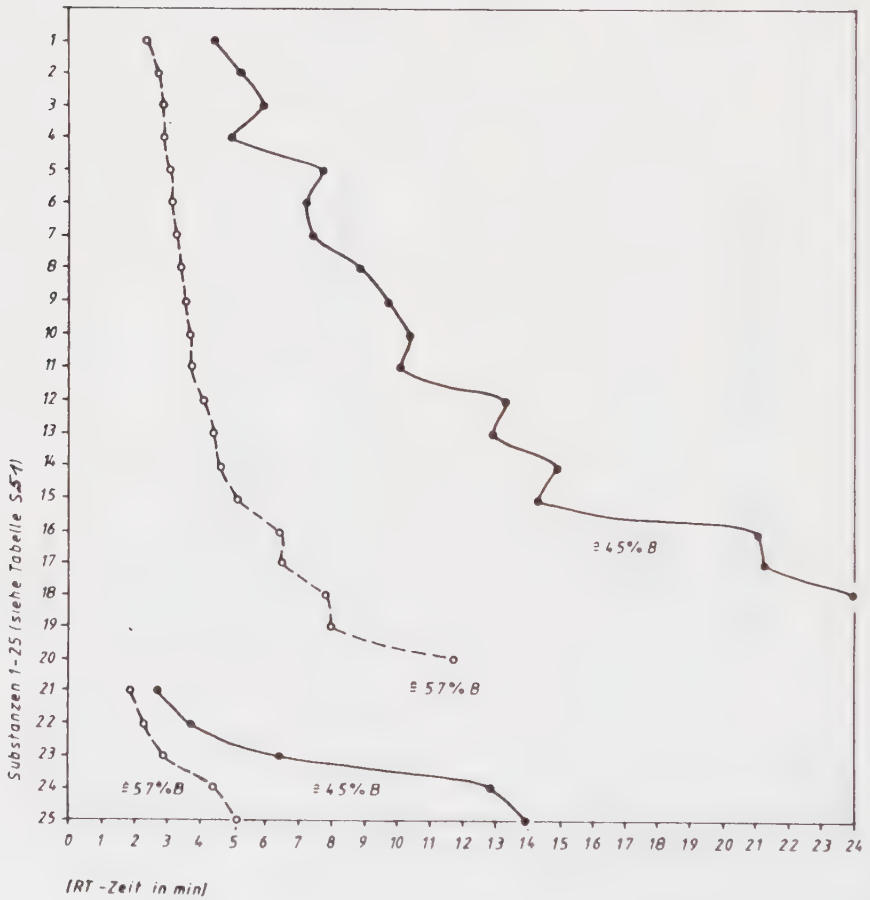


Abb. 10 Änderung der Retentionszeiten bei unterschiedlichem %B

Tabelle 2 zu Abbildung 10

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule 125 mm + Vorsaule

Lösungen : 1 mg %ig = 100 mg Substanz pro 10 µl Einspritzung

Elutionsmittel A : Phosph.Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

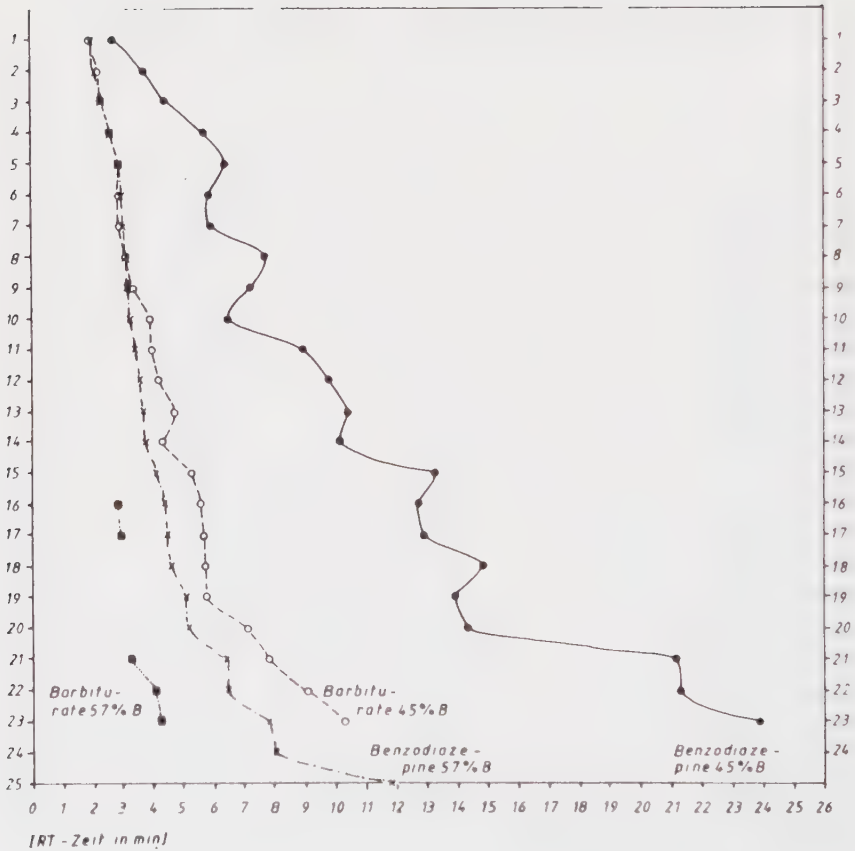
B : Methanol

Abschwächung 2⁵

Flußrate 1 ml/min

Ofentemperatur 40⁰ C

Änderung von %B	45	57
	Retentionszeiten	
1. Flurazepam	4,44	2,35
2. Oxazolam	5,52	2,76
3. Bromazepam	5,93	2,89
4. Medazepam	4,95	2,93
5. Clonazepam	7,76	3,17
6. Nitrazepam	7,25	3,20
7. Chlordiazepoxid	4,59/6,45	3,30
8. Flunitrapezam	8,97	3,41
9. Clobazam	9,79	3,59
10. Lorazepam	10,41	3,73
11. Oxazepam	10,11	3,75
12. Triazolam	13,31	4,13
13. Temazepam	12,96	4,43
14. Lormetazepam	14,95	4,61
15. Dikaliumchlorazepat	14,34	5,17
16. Ketazolam	21,17	6,44
17. Diazepam	21,29	6,50
18. Clotiazepam	23,99	7,83
19. Camazepam	34,34	8,01
20. Prazepam		11,74
21. N-Aminoerivat von Flunitrazepam	2,70	1,90
22. N-Acetaminoderivat v. "	3,76	2,30
23. Norflunitrapezam	6,46	2,86
24. Hydroxydiazepam	12,78	4,40
25. N-Desmethyldiazepam	13,99	5,13



Substanzen 1 - 25 siehe Tabelle 3

Substanzen 1 - 23 siehe Tabelle 4

Abb.11 Änderung der Retentionszeiten bei Unterschiedlichen Elutionsmittel A, %B und Wellenlängen

Tabelle 3 zu Abbildung 11

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule 125 mm + Vorsäule

Lösungen : 1 mg %ig = 100 mg Substanz pro 10 µl Einspritzung

Abschwächung 2⁵ Flußrate 1 ml/min Ofentemperatur 40°C

Elutionsmittel A:	Phosph.Puffer	Phosph.Puffer	H ₂ O
B:	Methanol	Methanol	Methanol
%B:	45	57	45
Wellenlänge :	235/600	235/600	220/600

Retentionszeiten:

1. N-Aminoderivat	o 2,70	1,90	2,98
2. N-Acetaminoderivat	o 3,76	2,30	4,29
3. Flurazepam	4,44	2,35	7,40
4. Oxazolam	* 5,52	2,76	----
5. Norflunitrazepam	6,46	2,86	6,71
6. Bromazepam	5,93	2,89	6,57
7. Medazepam	* 4,95	2,93	----
8. Clonazepam	7,76	3,17	7,74
9. Nitrazepam	7,25	3,20	7,38
10. Chlordiazepoxid	4,59/6,45	3,30	14,50
11. Flunitrazepam	8,97	3,41	8,69
12. Clobazam	9,79	3,59	9,34
13. Lorazepam	10,41	3,73	10,06/14,29
14. Oxazepam	10,11	3,75	9,75
15. Triazolam	13,31	4,13	13,07
16. Hydroxydiazepam	12,78	4,40	12,52
17. Temazepam	12,96	4,43	14,40
18. Lormetazepam	14,95	4,61	14,34
19. N-Desmethyldiazepam	13,99	5,13	16,20
20. Dikaliumchlorazepat	14,34	5,17	16,23
21. Metazolam	21,17	6,44	22,60
22. Diazepam	21,29	6,50	22,46
23. Clotiazepam	23,99	7,83	39,05
24. Camazepam	34,34	8,01	32,58
25. Prazepam		11,74	

o = von Flunitrazepam

* = kein Peak H₂O/MeOH

Tabelle 4 zu Abbildung 11

Säule : MN Nucleosil 5_{C₁₈} Stahlsäule 125 mm + Vorsäule

Lösungen : 1 mg %ig = 100 mg Substanz pro 10 µl Einspritzung

Abschwächung 2⁵ Flußrate 1 ml/min Ofentemperatur 40°C

Elutionsmittel A:	Phos.Puff.	Phos.Puff.	H ₂ O
B:	Methanol	Methanol	Methanol
%B:	45	57	45
Wellenlänge:	2220/600	235/600	220/600

Retentionszeiten

1. Coffein	2,08		2,33
2. Barbital	2,09		2,28
3. Primidon	2,42		2,74
4. Allobarbital	2,67		2,99
5. Phenobarbital	2,93		2,39
6. Brallobarbital	2,99		3,40
7. Aprobarbital	3,11		3,48
8. Crotarbital	3,13		3,50
9. Propallylon	3,38		3,89
10. Cyclobarbital	3,94		4,64
11. Cyclopentobarbital	3,99		4,76
12. Butalbital	4,22		4,92
13. Hexobarbital	4,74		5,75
14. Phenytoin	* 4,31		----
15. Gluthetimid	5,28		6,63
16. Heptabarbital	* 5,60	2,85	----
17. Vinylbital	5,68	2,93	6,90
18. Phenobarbital	5,71		7,04
19. Amobarbital	5,79		7,06
20. Secobarbital	7,12		8,92
21. MPPH	7,86	3,25	9,93
22. Methaqualon	9,01	4,03	12,95
23. Methohexital	10,28	4,22	13,63

* = kein Peak H₂O/MeOH

Wie es auch aus den Abbildungen 10 und 11 ersichtlich ist, ist es möglich, nach der Wiederholung der Untersuchung bei Wiederverwendung von gleichen Proben und bei der Änderung von λB oder der Wellenlänge, die erhaltenen Ergebnisse zu differenzieren, bzw. zu bestätigen.

2.2.9. Die Retentionszeiten und die K' -Werte der 1 mg %igen Standardlösungen von Benzodiazepinen, Barbituraten, Coffein und MPPH bei den optimierten Nachweisbedingungen.

$$\text{Es gilt : } K' - \text{Wert} = \frac{\text{Retentionszeit Substanz}}{\text{Retentionszeit Lösungsmittel (hier Ethanol)}} = X$$

1,42

Tabelle 5. Retentionszeiten der Benzodiazepine

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule 125 mm + Vorsäule

Elutionsmittel A: Phos.Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

B: Methanol

Abschwächung 2⁵

λB: 57

Flußrate 1 ml/min

	Retent. Zeiten	K' -Werte
1. 7-Amoniderivat v. Flunitrazepam	1,90	1,34
2. 7-Acetaminoderivat von "	2,30	1,62
3. Flurazepam	2,35	1,66
4. Oxazolam	2,76	1,94
5. Norflunitrazepam	2,86	2,01
6. Bromazepam	2,89	2,04
7. Medazepam	2,93	2,07
8. Clonazepam	3,17	2,23
9. Nitrazepam	3,20	2,25
10. Chlordiazepoxid	3,30	2,32
11. Flunitrazepam	3,41	2,40
12. Clobazam	3,59	2,53
13. Lorazepam	3,73	2,63
14. Oxazepam	3,75	2,64
15. Triazolam	4,13	2,91
16. Hydroxydiazepam	4,40	3,10
17. Temazepam	4,43	3,12
18. Lormetazepam	4,61	3,25
19. N-Desmethyldiazepam	5,13	3,61
20. Dikaliumchlorazepat	5,17	3,64
21. Ketazolam	6,44	4,54
22. Diazepam	6,50	4,58
23. Clotiazepam	7,83	5,51
24. Camazepam	8,01	5,64
25. Prazepam	11,74	8,27

Tabelle 6. Retentionszeiten der Barbiturate, Coffein + MPPH

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule 125 mm + Vorsäule

Elutionsmittel A: Phos.Puffer pH 2,3

Wellenlänge : 220/600 nm

B: Methanol

Abschwächung 2⁶

%B: 45

Flußrate 1 ml/min

20 µl pro Einspritzung

	Retentionszeiten:	K'-Werte:
1. Coffein	2,08	1,46
2. Barbital	2,09	1,47
3. Primidon	2,42	1,70
4. Allobarbital	2,67	1,88
5. Phenobarbital	2,93	2,06
6. Brallobarbital	2,99	2,11
7. Aprobarbital	3,11	2,19
8. Crotarbital	3,13	2,20
9. Propallylonal	3,38	2,38
10. Cyclobarbital	3,94	2,77
11. Cyclopentobarbital	3,99	2,81
12. Butalbital	4,22	2,97
13. Phenytoin	4,31	3,04
14. Hexobarbital	4,74	3,34
15. Gluthetimid	5,28	3,72
16. Heptabarbital	5,60	3,94
17. Vinylbital	5,68	4,00
18. Pentobarbital	5,71	4,02
19. Amobarbital	5,79	4,08
20. Secobarbital	7,12	5,01
21. MPPH	7,86	5,53
22. Methagualon	9,01	6,35
23. Methohexital	10,28	7,24

2.3. Herstellung der untersuchten Lösungen, Applikation des Nachweisverfahrens und Auswertung der erhaltenen Daten

2.3.1. Standardlösungen

Das Verfahren wurde zuerst für 1 mg %ige Standardlösungen optimiert. Die Standardlösungen wurden durch Auflösen von Reinsubstanzen in Ethanol hergestellt.

Betrag die Einspritzung 10 μ l, enthielt dieses Volumen 1 μ g = 100 ng Reinsubstanz.

2.3.2. Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wird als dreifaches Rauschen definiert.

Es ist wichtig, daß schon geringe Mengen der Substanzen nachgewiesen werden können. Vor allem betrifft diese Forderung die Benzodiazepine, deren Konzentrationen in Körperflüssigkeiten wesentlich niedriger sind, als die Konzentrationen der Barbiturate.

Blutspiegelwerte von $\mu\text{g/ml}$ sind für die Benzodiazepine schon sehr hohe, den therapeutischen Bereich meist überschreitende Werte.

Z.B. ist bei einer Gabe von 3 x täglich 3 mg (insgesamt 9 mg tgl.) von Bromazepam im Laufe von 19 Tagen die Konzentration im Blut zwischen 81 und 154 ng/l (Schütz 1980).

Ausführliche Angaben über die Blut - Plasma - Konzentration einzelner Benzodiazepine sowie auch über ihre verschiedenen Nachweismöglichkeiten enthalten die Veröffentlichungen von Schütz (Schütz 1978, 1980, 1982).

Nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen lag bei den ausgearbeiteten Arbeitsbedingungen die Nachweisgrenze im Bereich zwischen 1 - 10 ng.

Bestimmung der Nachweisgrenze

Säule : Riedel de Haën ¹⁰C₁₈ Glassäule von 300 mm

Elutionsmittel A: Phos.Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

B: Methanol

%B: 57

Flußrate 1 ml/min

Standardlösungen von Oxazepam in Ethanol



Abb. 12 a)

0,01 mg %ige Lösung = 1 ng/ μ l Einspritzung

Abschwächung 2⁵

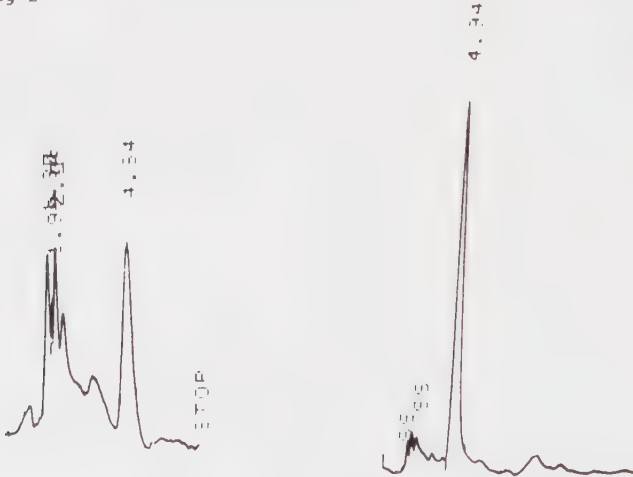


Abb. 12 b)

0,1 %ige Lösung =

10 ng / 10 μ l Einspritzung

Abschwächung 2³

Abb. 12 c)

1 mg %ige Lösung =

100 ng/10 μ l Einspritzung

Abschwächung 2⁵

2.3.3. Bezugssubstanz

Als Bezugssubstanz - oder als interner Standard wurde für die Benzodiazepine - Triazolam für die Barbiturate - MPPH = 5 - (-p-Methylphenyl) - 5 - phenylhydantoin gewählt.

Diese Bezugssubstanzen wurden gewählt, da sie ihre Retentionszeiten in Bereichen haben, die nicht stören, d.h. mit den Retentionszeiten anderer Substanzen nicht kollidieren.

Für alle untersuchten Substanzen wurden die Verhältnismerte zu diesen Bezugssubstanzen ausgerechnet, wie es folgende Beispiele zeigen:

Berechnungen zum inneren Standard - Beispiel

Säule : Riedel de Haën ¹⁰C₁₈ Glassäule von 300 mm

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 57

Wellenlänge : 235 / 600 nm

Abschwächung 2⁴

Flußrate 1 ml/min

1 mg %ige Lösungen von Triazolam und a) Diazepam

b) Oxazepam

Bezugswerte zu Triazolam:

a) Mittelwerte

	Retent. Zeit	Fläche	Spitzen (Peak)- höhe in cm
Diazepam	8,55	15665	4,75
Oxazepam	4,65	15130	5,62

b) Verhältnis zu Triazolam (= $\frac{\text{Wert - Triazolam}}{\text{Wert Benzodiazepin}}$)
z.B. Oxazepam

	Retent. Zeit	Fläche	Spitzen (Peak)- höhe in cm
Diazepam	1,45	1,64	1,56
Oxazepam	0,79	1,56	1,86

c) Verhältnis : $\frac{\text{Verhältnis v. Benzodiazepin zu Triazolam}}{\text{Verhältnis v. Diazepam zu Triazolam}}$

	Retent. Zeit	Fläche	Spitzen (Peak)- höhe in cm
Oxazepam	0,54	0,95	1,19

2.3.4. Berechnung der Ausbeuten

Um die optimalen Bedingungen für die Aufarbeitung der Blutproben zu bestimmen wurden einige Verfahren ausprobiert und folgendermaßen ausgewertet:

Es wurden bei exakt gleichen Bedingungen:

- a) 1 mg %ige Standardlösungen
- b) Blutproben, die diese Substanzen in gleichen Mengen enthielten

untersucht.

Wenn die Flächen - Werte und Spitzen - Höhen in cm bei Standardlösungen gleich 100% sind, dann ergeben die Flächen-Werte und die Spitzen-Höhen in cm bei Blutproben die Ausbeute-Werte.

Für die in dieser Arbeit gewählte Methode der Probenaufbereitung wurden Ausbeuten von 90 - 95% erzielt.

2.3.5. Blutproben

Alle Proben wurden so hergestellt, daß im eingespritzten Volumen von 10 µl genau 100 ng von der jeweils angegebenen Standard-Substanz enthalten waren.

Um die optimale Extraktion zu erreichen, wurden verschiedene Verfahren mit Humanalbumin überprüft, wobei sich nach mehreren Versuchen folgende Methode als optimale erwies:

Es wurde:

5 ml Albumin (5 %ige Lösung) mit
5 ml NH_3 Puffer von pH 9,5 und
50 µl Standard (z.B. 10 %ige Diazepam-Lösung) gemischt, dann
10 min. inkubiert. Danach wurden 2 ml vom Ansatz mit 1 ml Wasser
gemischt, auf Extrelut^(R) F. Merck gegeben und mit 15 ml Elutions-
gemisch (Äther / Äthylacetat) eluiert. Nach 10 Minuten wurde das
Lösungsmittel am Rotavapor eingedampft, die Trockensubstanz wurde
in 10 µl Methanol gelöst und in Spritzfläschchen gefüllt.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden die Extrelutsäulchen^(R)
der Fa. Merck verwendet. Diese Fertigsäulchen sind mit Kieselgur-
Tragermaterial gefüllt, auf welches die untersuchten Proben verteilt
werden. Mit einem unpolarem Lösungsmittel können dann die lipphophilen
Substanzen eluiert werden.

Die Porosität des Füllstoffes bewirkt eine große Austauschfläche.

Die an Humanalbumin-Proben optimierte Methode wurde auch auf
Blutproben angewendet, wobei bei den Barbiturat Proben außer des NH_3
Puffers auch ein saurer Puffer verwendet wurde.

2.3.5.1. NH_3 Puffer

Zu 5 ml Humanblut und 5 ml NH_3 - Puffer von pH 9,5 wurden 50 μl der 10 %igen Standard Lösung zugegeben.

Der Einsatz wurde gemischt und 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 2 ml vom Einsatz mit 1 ml Wasser gemischt und auf Extrelut^(R) F. Merck gegeben. Mit 15 ml Elutionsgemisch (Äther / Äthylacetat) wurde eluiert, nach 10 Minuten am Rotavapor eingedämpft, die Trockensubstanz in 100 μl Methanol (oder Äthanol) gelöst und die Lösung in Spritzfläschchen gefüllt.

(Zwischen methanolischen und äthanolischen Lösungen ergab sich kein wesentlicher Unterschied).

2.3.5.2. CH_3COOH - Puffer

Zu 1 ml Humanblut wurde 10 μl 10 %ige Standard-Lösung (z.B. MPPH) gegeben und der Einsatz wurde mit CH_3COOH - Puffer von pH 4 auf 3 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten wurde mit 15 ml Chloroform eluiert, nach weiteren 10 Minuten am Rotavapor eingedämpft, die Trockensubstanz in 100 μl Methanol gelöst und die Lösung in Spritzfläschchen gefüllt.

Es erwies sich jedoch der NH_3 - Puffer auch für die Barbiturate günstiger als der CH_3COOH - Puffer, da die Ausbeuten einiger Stoffe, wie auch z.B. MPPH, günstiger waren.

Versuche mit Humanalbumin

Beispiele

Säule : Riedel de Haën ¹⁰C₁₈ Glassäule von 300 mm

Elutionsmittel A : Phos.Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

B : Methanol

Abschwächung 2⁶

%B : 57

Flußrate 1 ml / min

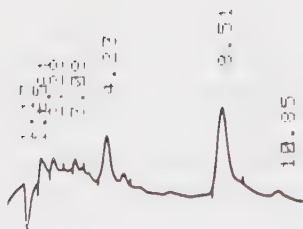


Abb. 13 a)

5 ml Albumin (5%ige Lösung)

5 ml NH₃-Puffer

50 µl Standard (10%ige Diazepam-Lösung mischen, 10 min. inkubieren

1 ml mit H₂O auf 3 ml ergänzen

-auf Extrelut^(R) geben, usw.

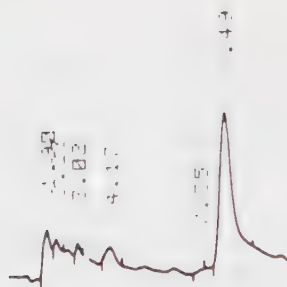


Abb. 13 b)

5 ml Albumin (5%ige Lösung)

5 ml NH₃-Puffer

50 µl Standard (10%ige Diazepam-Lösung mischen, 10 min. inkubieren, 2 ml mit H₂O auf

3 ml ergänzen-auf Extrelut^(R) geben, usw.

Versuche mit Blutproben - Beispiele

Benzodiazepine

Elutionsmittel A : Phos.Puffer pH 2,3

Wellenlänge 235/600 nm

B : Methanol

%B : 57

Flußrate 1,5 ml/min

1 mg %ige Standardlösungen in Ethanol

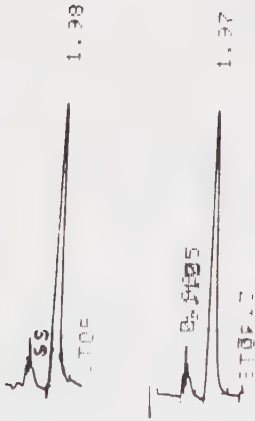


Abb. 14 a) Bromazepam
Abschwächung 2^6

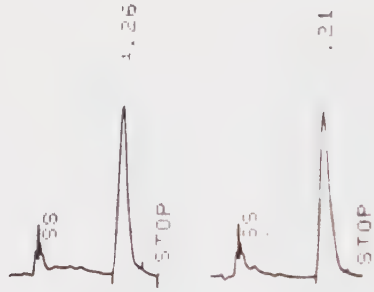


Abb. 14 b) Diazepam
Abschwächung 2^6

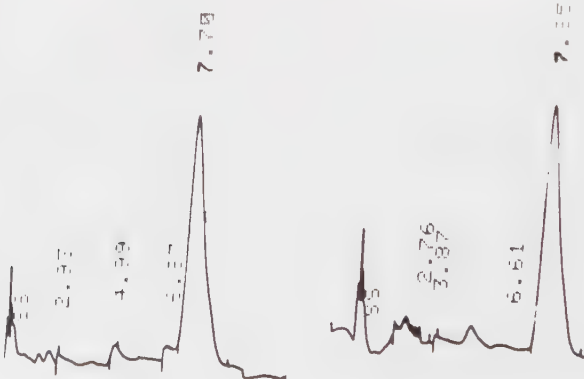


Abb. 14 c) Prazepam
Abschwächung 2^5

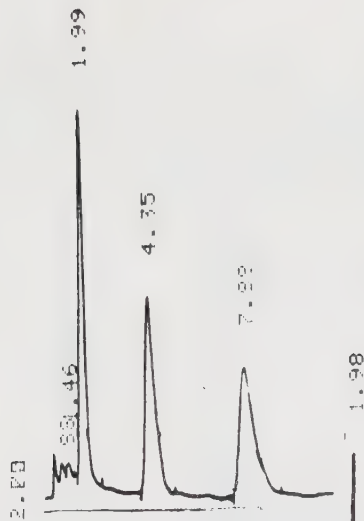


Abb. 15 a)

Blut+NH₃-Puffer+Standardlösungen von Bromazepam, Diazepam, Prazepam in Methanol

Abschwächung 2⁶

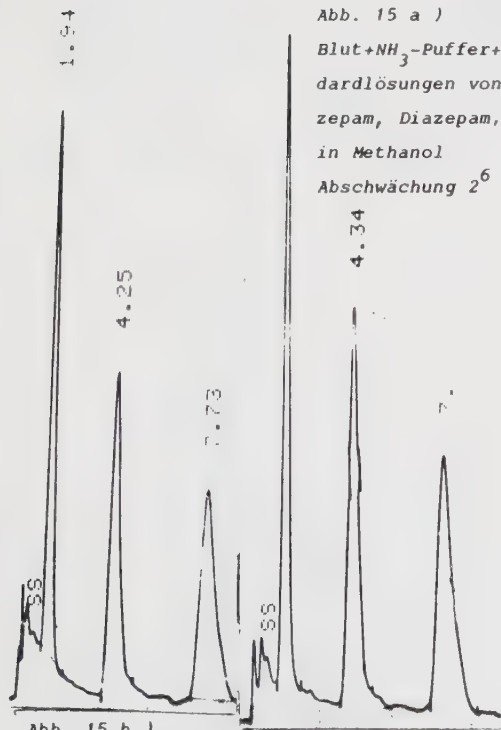


Abb. 15 b)

Blut+NH₃-Puffer+Standardlösungen v. Bromazepam, Diazepam, Prazepam in Methanol

Abschwächung 2⁵

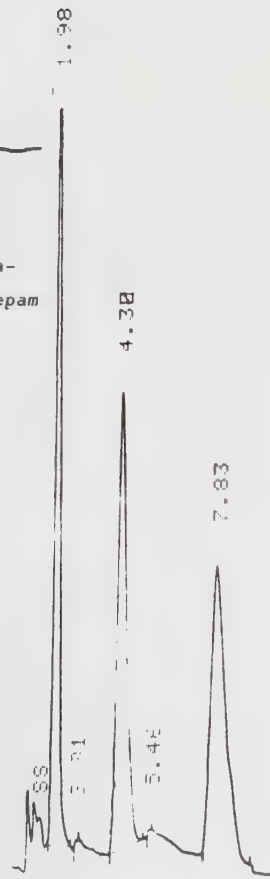


Abb. 15 c)

Blut+NH₃-Puffer+Standardlösungen v. Bromazepam, Diazepam, Prazepam in Ethanol

Abschwächung 2⁵

Da die Proben der Abbildungen 14 a) und 14 b) und 15 unter gleichen Bedingungen untersucht wurden, können für diese Substanzen, als Beispiel, die Ausbeuten berechnet werden.

Standard Lösungen

	<i>Retentionszeit</i>	<i>Fläche</i>	<i>Spitzen-Höhen (cm)</i>
<i>Bromazepam (Abb. 14a)</i>	<i>1,98</i>	<i>38523</i>	<i>5,3</i>
<i>Diazepam (Abb. 14b)</i>	<i>4,23</i>	<i>38835</i>	<i>3,0</i>

Blutproben

	<i>Retentionszeit</i>	<i>Fläche</i>	<i>Spitzen Höhen (cm)</i>	<i>Ausbeute</i>
<i>Bromazepam (Abb. 15c)</i>	<i>1,86</i>	<i>33120</i>	<i>5,0</i>	<i>94,3%</i>
<i>Diazepam (Abb. 15c)</i>	<i>4,28</i>	<i>34875</i>	<i>2,7</i>	<i>90%</i>

Barbiturate

Elutionsmittel A : Phos.Puffer pH 2,3

B : Methanol

λB : 45

Wellenlänge 220/600

Abschwächung 2⁶

Flußrate 1 ml/min

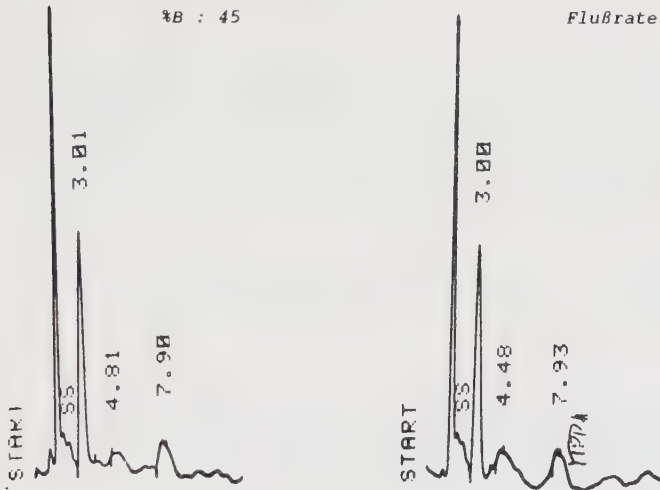


Abb. 16 a)

Blut + Phenobarbital + MPPH + CH₃COOH - Puffer (pH 4)

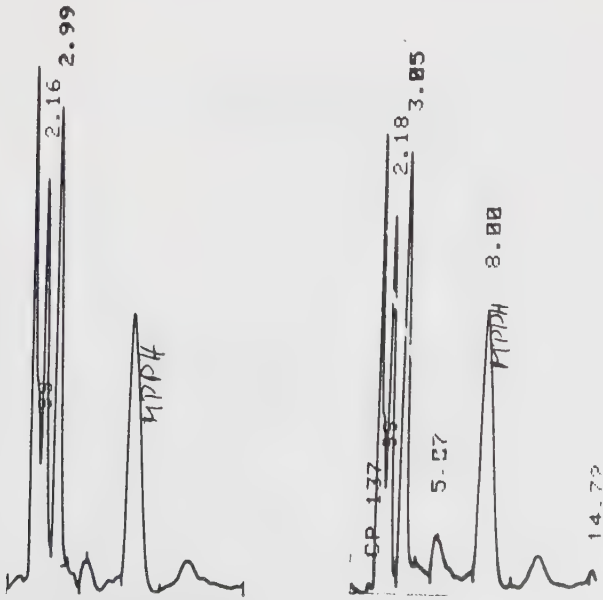


Abb. 16 b)

Blut + Phenobarbital + MPPH + NH₃ - Puffer (pH 9,5)

2.4. Anwendung in der täglichen Praxis

Die ausgearbeiteten Bedingungen wurden anschließend an mehreren Beispielen aus den täglichen Routineuntersuchungen des Institutes für Gerichtsmedizin München überprüft und durch Vergleiche mit Untersuchungsergebnissen, die durch andere Verfahren bereits festgestellt worden waren, wurde die Richtigkeit der Analysen bestätigt.

Zu den Blutproben (z.B. 5 ml) wurden entsprechende Mengen von Standardlösungen (z.B. 50 µl - 10 µg) und Puffer (z.B. 5 ml) zugegeben.

2 ml von diesem Einsatz wurden mit 1 ml Wasser gemischt, auf Extrelut[®] gegeben, mit Elutionsgemisch (Äther, Äthylalkohol) eluiert, nach 10 Minuten eingedämpft, die Trockensubstanz wurde in 100 µl Methanol oder in 100 µl Ethanol gelöst, die Lösung wurde in Spritzfläschchen gefüllt und mit der HPLC unter folgenden Bedingungen untersucht:

A. Benzodiazepine :

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule von 125 mm + Vorsäule

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 57

Abschwächung : 2⁵

Flußrate : 1 ml / min

Ofentemperatur : 40⁰ C

B. Barbiturate, Coffein, MPPH und Benzodiazepine:

Säule : MN Nucleosil ⁵C₁₈ Stahlsäule von 125 mm + Vorsäule

Elutionsmittel A : Phosphat Puffer pH 2,3

B : Methanol

%B : 45

Abschwächung : 2⁶

Flußrate : 1 ml / min

Ofentemperatur : 40⁰C - 20 µl pro Einspritzung

Nach den Retentionszeiten wurden die Substanzen identifiziert.

Ein Vergleich der Flächen - Werte und der Spitzen - Höhen mit denen der Standard - Substanzen ergibt die quantitativen Angaben.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt und auf die Brauchbarkeit überprüft.

Mit der hier erarbeiteten Hochdruckflüssigkeitschromatographischen Methode können qualitative und quantitative Simultanbestimmungen wie sie in der forensischen Toxikologie gebraucht werden, durchgeführt werden.

Das in dieser Arbeit dargestellte Nachweisverfahren wurde mit folgenden Geräten ausgearbeitet:

Helwet - Packard 1084 B Liquid Chromatograph mit :

- variablem Wellenlänge-Detektor 79875 A
- UV Detektor 79870 A
- variablem Volumen Injektor 79841 A
- 79850 A LC Terminal
- MN Nucleosil $^5C_{18}$ Stahlsäule (mit Vorsäule) v. 125 mm.

Als optimal für den Nachweis der insgesamt 58 untersuchten Reinsubstanzen in Blutproben wurden folgende Bedingungen bestimmt:

- konstante Ofentemperatur von $40^{\circ}C$
- bei Einspritzung von $10\ \mu l$ wurde die Abschwächung von 2^5 , bei der Einspritzung von $20\ \mu l$ dagegen die Abschwächung von 2^6 gewählt
- um die Störpeaks zu eliminieren wurde die Steigungsempfindlichkeit nach den ersten 1,7 Minuten von 81,00 auf 0,20 geändert
- die Elutionsmittel wurden vor der Anwendung mit Helium entgast
- Als Elutionsmittel A wurde Phosphatpuffer von pH 2,3, als Elutionsmittel B wurde Methanol gewählt.
- als Mischverhältnis der Elutionsmittel wurde für die Barbiturate 45 % B, für die Benzodiazepine dagegen 57 % B und auch 45 % B festgelegt.

- für den Nachweis der Benzodiazepine wurde bei einem Mischverhältnis von 75% B die Wellenlänge von 235 / 600 nm gewählt. Für den Nachweis der Barbiturate sind diese Bedingungen ungünstig. Die Barbiturate und gleichzeitig auch die Benzodiazepine wurden bei einem Mischverhältnis von 45 % B und der Wellenlänge 220 / 600 nm nachgewiesen.
- die Nachweisgrenze lag im Bereich von 1 - 10 ng Substanz
- nach der Optimierung des Verfahrens für 1 mg %ige Standardlösungen wurden bei gleichen Bedingungen Blut - Proben mit bekannten Mengen einzelner Substanzen untersucht
- die Blutproben wurden nach folgender Vorschrift vorbereitet:
 - zu den Blutproben (z.B. 5 ml) wurden entsprechende Mengen von Standardlösungen (z. B. 50 µl - 10 mg %ig) und Puffer (5 ml NH_3 Puffer von pH 9,5) zugegeben. 2 ml von diesem Einsatz wurden mit 1 ml Wasser gemischt, auf Extrelut^(R) von F. Merck gegeben, mit Elutionsgemisch (Äther / Äthylalkohol) eluiert, nach 10 Min. am Rotavapor eingedampft, die Trockensubstanz wurde in 100 µl Methanol oder 100 µl Ethanol gelöst, die Lösung in Spritzfläschchen gefüllt und untersucht.
- nach einem Vergleich der erhaltenen Flächen - Werte und der Peak-Höhen von Standardlösungen (gleich 100 %) und von Blutproben mit bekannten Substanzmengen wurden für das verwendete Verfahren der Blutproben - Vorbereitung die Ausbeuten von 90 - 95 % erhalten
- nach diesen Vorschriften wurden zuletzt auch einige Blutproben aus der täglichen Praxis des Institutes der Gerichtsmedizin untersucht, die erhaltenen Ergebnisse wurden durch andere chromatographische Methoden bestätigt
- die Identifizierung der Substanzen erfolgt nach dem Auswerten der Retentionszeiten
- ein Vergleich der Flächenwerte und der Spitzenhöhen der zu bestimmenden und der bekannten Standard Substanzen ergibt die quantitativen Angaben

Nach Schwedt (1983) findet die Hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode immer breitere Anwendung. Er berichtet über die Nachweisverfahren mit der HPLC in der pharmazeutischen Industrie (Qualitätskontrollen) und in der klinischen Chemie (Therapie - Kontrolle).

Harzer (1977), Violon (1982) und Vree (1981) haben Methoden zur Analyse mehrerer Benzodiazepine beschrieben.

Bocker (1982) und Dark (1973) analysierten mit der HPLC die Barbiturate. Methoden zum Nachweis gleichzeitig mehrerer Arzenimittel beschrieben Harbin (1980) und Rehm (1981).

Daldrup (1980, 1981) hat die Ergebnisse und die Bedingungen der Bestimmung von merheren Arzneimitteln, Rauschmitteln und verwandten Verbindungen nach acht unterschiedlichen Chromatographieverfahren ausgearbeitet und die relativen Retentionszeiten festgehalten.

Auch über die schnelle, rationelle und effektive Probenvorbereitung wurde von Groot (1982) und Daldrup (1980, 1981) berichtet.

Der Nachteil dieser Methoden ist, daß sie nicht für die meisten in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Barbiturate, Benzodiazepine , sowie ihre wichtigsten Metabolite und für Coffein für simultane und gleichzeitig qualitative und quantitative Bestimmungen anwendbar sind.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 58 pharmakologisch wirksame Reinsubstanzen geprüft. Einbezogen wurden alle in der Bundesrepublik Deutschland gebräuchlichen Barbiturate, Benzodiazepine die wichtigsten Benzodiazepin - Metabolite , Coffein und MPPH.

Diese 58 Substanzen können auf einmal in einer Blutprobe nachgewiesen werden. Daher stellt diese Methode ein schnelles, wiederholbares, wirtschaftliches und unkompliziertes Verfahren dar, mit dem menschliches Blut auf Vorhandensein von Barbituraten, Benzodiazepinen, Benzodiazepin Metaboliten und Coffein in der täglichen Routine - Praxis der forensischen Toxikologie untersucht werden kann. Dabei können die vorhandenen Substanzen, wie bereits erwähnt, qualitativ und quantitativ erfaßt und bestimmt werden.

Da in der Gerichtsmedizin bekanntlich alle Ergebnisse durch zwei verschiedene Verfahren bestätigt sein müssen, stellt diese Methode somit ein wichtiges Ergänzungsverfahren dar. Damit können die, nach einem anderen Verfahren gefundenen Untersuchungsergebnisse in ihrer Aussage erhärtet werden. Drasch wendet die hier erarbeitete Methode bereits seit 1983 in der täglichen Praxis bei Routineuntersuchungen in seinem Insitut an.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Nachweisverfahren mit der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Methode zur qualitativen und quantitativen Simultanbestimmung von 58 Substanzen bei einer Blutprobenuntersuchung geprüft und optimiert.

Es wurde ein Helwet - Packard 1084 B Liquid Chromatograph verwendet.

Die optimale Bedingung für den Nachweis wurde gefunden:

für die Benzidiazepine: Elutionsmittel A: Phosphat Puffer pH 2,3

B: Methanol

Abschwächung : 2^5

Flußrate 1 ml / min

Ofentemperatur 40°C

bei Wellenlänge 235/600 nm = % B 57

oder bei Wellenlänge 220/600 nm = % B 45

für die Barbiturate : Elutionsmittel A: Phosphat Puffer pH 2,3

B: Methanol

%B: 45

Abschwächung 2^6

Flußrate 1 ml/min

Wellenlänge 220/600 nm

20 µl pro Einspritzung

Nach dem verwendeten Verfahren der Blutprobenaufbereitung wurden die Ausbeuten von 90 - 95 % erzielt. Die Nachweisgrenze lag im Bereich von 1 - 10 ng Substanz.

Dieses Verfahren stellt ein schnelles, wiederholbares, wirtschaftliches und unkompliziertes Verfahren dar, mit dem das menschliche Blut auf Vorhandensein von Coffein, Barbituraten, Benzodiazepinen und Benzodiazepin - Metaboliten bei den Reihenuntersuchungen in der täglichen Routinepraxis der forensischen Toxikologie untersucht werden kann. Das Verfahren findet bereits in der täglichen Praxis breite Anwendung.

5. Literaturverzeichnis

- Albert, H.H. von: Behandlung von Schlafstörungen aus der Sicht des Neurologen. Internationales Symposium: Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen, München, IV. 113 - 115 (1982)
- Antoniadis, A.: Untersuchung zur Beteiligung von Gaba- und Benzodiazepinrezeptoren am Wirkungsmechanismus verschiedener, das Zentralnervensystem erregender oder dämpfender Pharmaka. Inauguraldissertation, Mainz, 1-2 (1981)
- Apelt, M.: Therapie der chronischen Schlafstörungen mit Benzodiazepinen: Literaturübersicht klinischer Untersuchungen mit und ohne Polygraphie. Inauguraldissertation, München, 2, 8 - 13, 135 - 139, 146 - 161 (1982)
- Apffel, J.A.T.V. Alfredson, R.E. Majors : Automated online multi-dimensional-high-performace liquid chroamtografic techniques for the clean-up and analysis of water-soluble samples. Journal of Chromatography, 43, 206 (1981)
- Auwers, K.,F. von Meyenburg : Über eine neue Synthese von Derivaten des Isindazols. Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft, 24, 2370 - 2388 (1981)
- Bente, H.B.,D.R. Baker: Application of a Time - Programmable Variable Wavelength Detector to the HPLC Analysis of Antiepileptic Drugs. Hewlett - Packard - Company , Avondale PA 19311, Technical Paper No. 76, 1 - 5 (1982)
- Bayer, A. von: Liebigs Ann. Chem., 130, 129 (1864)
- Bocker, R.: Rapid analysis of hexobarbital and its main metabolits in mice by HPLC. Journal of Chromatography, 228, 350 - 354 (1982)
- Bohn, G.,P.Clasing : Zum Problem einheitlicher Untersuchungsmethoden bei der Antidoping - Kontrolle. Schweizer Zeitschrift, 1941 (1971)

- Bond, A.J., M.H. Lader : The residual effects of flurazepam
Psychopharmakologia (Berl.) 32, 223 (1973)
- Bond, A.J., M.H. Lader : Residual effects of flunitrazepam
Br. J. clin. Pharmac., 2, 143 (1975)
- Borbély, A.A., P. Mattmann, M. Loepfe, I. Fellmann, J. Gerne,
I. Strauch, D. Lehmann: Wirkung und Nachwirkung von
Flunitrazepam, Flurazepam und Triazolam auf das Schlaf-
EEG. Internationales Symposium : Benzodiazepine in der
Behandlung von Schlafstörungen, München , III.,
93 - 97 (1982)
- Braestrup, C., M. Nielsen : Benzodiazepine receptors. Arzneim.
Forsch. 30, 852 (1980)
- Clark, A. J. : Brit. med. Journal, 19/II, 4063 (1938)
- Clarmann, M.von : Toxikologie und Interaktionen. Internationales
Symposium : Benzodiazepine in der Behandlung von
Schlafstörungen, München , II., 71 - 74 (1982)
- Costa, E.A. Guidotti : Molecular-mechanismus in the re-
ceptor action of benzodiazepines. Ann. Rev. Pharma-
kol.Toxicol., 19, 531 - 545 (1979)
- Drasch, G., G. Kauert, L. von Meyer : Quantitative Bestimmung
von Schwermetallen mit HPLC nach Chelatextraktion aus
biologischem Material. Institut für Rechtsmedizin der
Universität München - Biotic Materials, Fresenius Z.
Anal. Chem, 317, 468 (1984)
- Elgass, H., A. Maute, R. Martin, S. George : Schnelles Spektral-
photometer als Detektor für die HPLC. Spektroskopie,
Labor Praxis, 4, 2 - 7 (1982)
- Eppert, G. : Einführung in die schnelle Flüssig-Chromatographie.
Reihe Wissenschaft, Vieweg Braunschweig/Wiesbaden (1979)
- Fischer, E., J. von Mering : Therap. d. Gegenwart, 44, 97 (1903)
- Forth, W., D. Henschler, W. Rummel: Allgemeine und spezielle
Pharmakologie und Toxikologie. Mannheim, 4, 410 - 411,
433 - 434, 501 - 505, 512 (1983)

- Gerlach, Ch.: Einfluss einer chronischen Niereninsuffizienz auf die Kinetik des Benzodiazepins Oxazepam. Inauguraldissertation, Bonn, 9 - 12, 18 - 19, 23 (1985)
- Greenblatt, D.J., M. Divoll, J.S. Harmatz, R.I. Shader : Oxazepam kinetics : effects of age and sex., J. Pharmacol. Exp. Ther., 215, 86 - 91 (1980)
- Greenblatt, D.J., R.I. Shader : Benzodiazepines in clinical practice. Raven Press, New York (1974)
- Groot, G.de, A.M.L.J. Grotenhuis-Mullenders : Combined Bonded - Phase / Liquid - Liquid Extraction as a rapid, specific Samplepretreatment Technique for the Determination of Benzodiazepines in Plasma by RF-HPLC. Unit for Pharmacokinetics, National Institute of Public Health, P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven (The Netherlands), 1 - 9 (1982)
- Harbin, D.N., F. Lott : The identification of drugs of abuse in urine usig reverse phase high pressure liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography 3 (2) , 243 - 256 (1980)
- Harzer, K., R. Barchet : Analyse von Benzodiazepinen und deren Hydrolysenprodukte, den Benzophenonen, durch Hochdruck-flüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase und ihre Anwedung auf biologisches Material. Journal of Chromatography, 132, 83 - 90 (1977)
- Hofler, K.-H. : Das Verhalten einiger Parameter des Lipid-Stoffwechsels unter Flunitrazepam - Prämedikation bei kieferchirurgischen Patienten : Verästerte Fettsäuren, freies Glycerin, Gesamt-Glycerin, Triglyceride, Gesamt-Lipide. Inauguraldissertation, Tübingen, 10-13 (1977)
- Horvarth, C., W. Melander : Liquid chromatography with hydro-carbonaceous bonded phases, theory and practice of reversed phase chromatography. Journal Chromatography 15, 393 (1977)

- Illwrick, R. Mc.: Forschung nach Feierabend. Vortrag anlässlich der Chromatographie - Tage, Königstein (1977)
- Iversen, E.L. : The present Status of Benzodiazepines in Psychopharmacology. *Arzneim.-Forschung. / Drug Research New Perspectives and Drug Therapy*, 30 (I), 907 - 910 (1980)
- Iwertowski, K.: Welchen praktischen Nutzen bieten programmierbare HPLC - Komponenten und - Systeme ? *Chromatographie, Labor - Praxis*, 5, 398 - 417 (1983)
- Kales, A., C. Allan, M.B. Scharf, J. Kales : Hypnotic drugs and their effectiveness: All night studies of insomniac subjects. *Arch. Gen. Psychiatry*, 23, 226-232 (1970)
- Kales, A., E.O. Bixler, J. Kales, M.B. Scharf : Comparative Effectiveness of nine hypnotic drugs : sleep laboratory studies. *Journal Clin. Phar.*, 17, 207 - 213 (1977)
- Kales, A., J. Kales : Recent advances in the diagnosis and treatment of sleep disorders. The relevance of sleep research to clinical practice, ed. by. G. Usdin. Brunner/Mazel, New York, 61 - 94 (1972)
- Kales, A., J. Kales : Sleep disorders. *N. Engl. Journ. Med.*, 290, 487 - 499 (1974)
- Kales, A., J. Kales, E. O. Bixler, M. B. Scharf : Effectiveness of hypnotic drugs with prolonged use : fluzepam and pentobarbital. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18, 356 - 363 (1975)
- Kales, A., L. A. Leo, S. Healey, E. Slye : Incidence of insomnia in the Los Angeles metropolitan area. *Sleep Research*, 3, 139 (1974)
- Kinawi, A., I. Baumgartl : Untersuchungen zur Interaktion von Chlordiazepoxid, Diazepam und Nitrazepam mit Phenprocumon. *Arzneim.Forsch. (Drug.Res.)* 26, Nr.11 (1976)

- Klotz, U. : Benzodiazepine - eine pharmakologische Übersicht für die Praxis, Stuttgart, Krankenhauspharmazei, 3. Jg., Nr. 3 (1982)
- Knabe, J. : Wissenswertes für die pharmazeutische Praxis über psychotrop wirksame Substanzen. Bericht der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft im Archiv der Pharmazie (Weinheim), 32 ad.vol. 295, 25 (1962)
- Knox, J.H.: Practical aspects of LC theory. Journ. Chromatography Sci., 15, 352 (1977)
- Krebs, K - F : Welche chromatographischen Trägermaterialien ? Chromatographie, Labor - Praxis, 1/2, 54 - 58 (1983)
- Kuschinsky, G., H. Lüllmann, T. Peters : Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Stuttgart - New York, 9, 215 - 222, 232 - 237, 255 - 260 (1981)
- Labhard, F. : Die Anwendung von Psychopharmaka in der psychosomatischen Medizin. Fortschritte der Arzneimittel - forschung, Basel, Band 10 (1966)
- Lader, M. : The present Status of the Benzodiazepines in Psychiatry and Medicine. Arzneim.Forsch. / Drug Research 30 (1), 910 - 913 (1980)
- Lang, W., H. Stephan : Über die mikrochemische Identifizierung von Schlafmitteln in der toxikologischen Praxis. Suddt.Apotheker Zeitung, 90, Nr. 38, 739 - 742 (1960)
- Leutner, V. : Klassifizierung und pharmakologische Etikettierung der Schlafmittel, Harrer, G. und V. Leutner (Eds.): Schlaf und Pharmacoon, Symposium - Schattauer, Stuttgart, New York, 257 (1978, 1979)
- Linke, H. : Kritik der Therapie - Nebenwirkung und Gefahren der Anwendungen psychotroper schmerzstillender Pharmaka. Das Deutsche Gesundheitswesen, 12, 1095 und 1146 (1962)
- Mallach, H.J., A. Moosmayer et al. : Pharmakokinetische Untersuchung über Resorption und Ausscheidung von Oxazepam in Kombination mit Alkohol. Dtsch.med.Wschr., 11 (1975)

- Mc Curdy, L. : The Short - term Use of Benzodiazepines. *Arzneim. Forsch. Drug.Res.*, 30 (I), 895 - 897 (1980)
- Meyenburg, F. von : Über die Einwirkung von Chlorkohlenoxyd auf Dimethyl und Diäthylmetaaminopheol. *Habilitations-schrift*, Tübingen (1895)
- Moebius, U.M.: Im Westen nichts Neues ? Alte und neue Benzodiazepin-Tranquilizer im Vergleich. *Arznei-Telegramm*, 9 / 81, 77 - 82 (1981)
- Monitor, : Theophylline in Adults, Children and Neonates, Waters associates (1976)
- Müller, W.E.: Benzodiazepin - Rezeptoren - Eigenschaften und Bedeutung. *Internationales Symposium : Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen*. München, I., 21 - 28 (1982)
- Ochs, H.R., I. Steinhaus, L. Locniscar, M. Knüchel, D.J. Greenblatt : Desmethyldiazepam Kinetics After Intravenous, Intramuscular and Oral Administration of Chlorazepate Dipotassium, *Klin.Wochenschr.*, 60, 411 - 415 (1982)
- Oelschläger, H.: *Pharmakokinetik der Benzodiazepine*, Internationales Symposium : Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen, München, I., 9 - 19 (1982)
- Olsen, R.W. : GABA - Benzodiazepine - Barbiturate receptor interactions. *Journ. Neurochem.*, 37, 1 (1981)
- Paul, S.M., P.J. Marangos, P. Skolnick : The benzodiazepine - GABA - Chloride ionophore complex : Common site of minor tranquilizer action. *Biol. Psychiatry*, 16, 213 (1981)
- Peters, U.H., M. Seidel : Medikamentenmißbrauch und Sucht bei Diazepam. *Arzneimittel Forschung* 20, 876 (1970)

- Foser, W., N. Kemper, S. Poser : Mißbrauch und Abhängigkeit bei Benzodiazepin - Hypnotika. Internationales Symposium : Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen, München, II., 63 - 70 (1982)
- Preuß, R. : Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, Band 2. - Beschreibung und Charakterisierung fluchtiger und im wesentlichen aus saurem Medium isolierbarer Wirkstoffe sowie anorganischer Gifte und Arzneimittel. Göttingen
- Pribilla, O. : Chlordiazepoxid (Studien zum Nachweis der Ausscheidung beim Menschen).Arzneimittel Forschung 14, 723 (1964)
- Prous, J.R.S.A. : Triazolam in medicamentos de actualidad. Drugs of today. Vol. VI. S. 199. Apdo de Correos 540, Barcelona (1970)
- Rehm, K.D., M. Steinigen : Praktische Erfahrungen mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Arzneimittelanalytik. Pharmazeutische Zeitung, Jg. 126, 1/3, 99 - 103 (1981)
- Rickels, K. : The significance of pharmacokinetics in practical application in sleep disturbances. Internationales Symposium : Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen, München, I., 41 (1982)
- Riedmann, M. : Low Dispersion Liquid - Chromatography. Symposium Column Liquid Chromatography, Labor Praxis, 5, 184 - 190 (1983)
- Riggenmann, H. - J. : HPLC - Lösungsmittel - Gradientenformung. Chromatographie, Labor Praxis, 5, 474 - 411 (1982)
- Romer, M. : Die akute Intoxikation mit Benzodiazepinen. Inauguraldissertation, Berlin, 4 - 24, 79 - 89 (1982)

- Roth, T., T. Roehrs, F. Zorick, E. Stepanski, R. Wittig:
Pharmacological and clinical consideration in
hypnotic use. Internationales Symposium : Benzo-
diazepine in der Behandlung von Schlafstörungen,
München, III., 85 (1982)
- Schmidt, G.: Forensischer Beweiswert toxikologischer Unter-
suchungsmethoden in Beitr. Gerichtl. Med., 25 (1969)
- Schmidt, H. - J.: Die Behandlung der Schlafstörungen aus der
Sicht des praktischen Arztes. Internationales Sympo-
sium : Benzodiazepine in der Behandlung von Schlaf -
störungen, München IV., 123 - 128 (1982)
- Schütz, H., V. Westenberger : Gaschromatographische Daten von
19 Hydrolyse Derivaten aus 12 wichtigen Benzodiazepinen
und 17 Hauptmetaboliten. 2. Rechtsmed. 82, 43 - 53
(1978)
- Schütz, H.: Nachweis und Bestimmung von Benzodiazepinen mit
Hilfe gaschromatographischer Methoden. Sitzung der
Arbeitsgruppe Analytik der Senatskommission der
Deutschen Forschungsgemeinschaft für Klinisch - Toxi-
kologische Analytik am 3. November 1980
a) Multi Methoden
b) Mono Methoden
- Schütz, H.: Interpretation von Benzodiazepinen in Körper-
flüssigkeiten. Deutsche Apotheker Zeitung, 122 Jg.,
Nr. 10, 3 (1982)
- Schütz, H., H. Fitz und Suphacheasabhan : Zur Spezifität des
Benzodiazepin - Screenings über primäre aromatische
Amine. Fresenius, 2. Anal. Chem., 314, 44 - 56
(1983)
- Schwedt, G.: Hard - und Software in der HPLC. Chromatographie,
Labor Praxis, 6, 566 - 572 (1983)
- Spatz, R.: Überlegungen zum Aufbau eines benutzerfreundlichen
Hochdruckflüssigkeitschromatographen. Labor Praxis,
5, 228 (1981)

- Sternbach, L.: Benzodiazepine : Von der Molekularbiologie zur klinischen Anwendung. Der Praktische Arzt, 9 (1982)
- Sved, S., R.D. Hossie, I.J. Mc Cilveray : The human metabolism of coffeine to theophylline. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, Vol.13 No. 2, 2 (1976)
- Takeuchi, T., D. Ishii: High - performance micropacked flexible columns in liquid chromatography. J. Chromatogr., 25, 213 (1981)
- Tietgen, K.: Affine Bindungsstellen für Benzodiazepine im Herzmuskel, Inauguraldissertation, Kiel, 2, 32 - 38 (1984)
- Veldkamp, W., R.N. Straw, C.M. Metzler, H.V. Demissianos : Efficacy and residual effect evaluation of a new hypnotic, triazolam. J. clin. Pharmacol, 14 102 (1974)
- Vermeulen, N.P.E.: Proefschrift, Universtiy of Leiden, the Neterlands (1980)
- Violon, Ch., L. Pessemieier, A. Vercruysse : HPLC of benzophenone derivatives for the determination of benzodiazepines in clinical emergencies. Journal of Chromapography, 236, 157 - 168 (1982)
- Vree, T.B., A.M. Baars, Y.A. Hekster, Van der Kleijn: Simultaneous determination of chlordiazepoxide and its metabolites in human plasma and urine by means of reserved phase HPLC. Journal of Chromatography, 222, 519 - 529 (1981)
- Wagner, H.J.: Vergleichende Untersuchungen über die zahlenmäßige Beziehung zwischen medikament - bzw. alkoholbeeinflußten Verkehrsteilnehmern. Zbl.Verkehr.-Med., 9 (1963)
- Waleczek, H.: Eine spezifische und empfindliche Methode zur Bestimmung von Barbituratkonzentrationen in Serum und Speichel nach Gabe therapeutischer Dosen. Inauguraldissertation, Bonn, 11 - 17, 35, 45 (1981)

- Wellhöner, H.: Schlafstörungen, eptileptische Erkrankungen.
In: Füllgraf, G., D. Palm (Eds.) : Pharmakotherapie,
klinische Pharmakologie, Fischer - Verlag, Stuttgart,
208 - 238 (1982)
- Zitmann, F.G.: Undesired effects of benzodiazepine hypnotics
and their cause. Internationales Symposium : Benzo-
diazepine in der Behandlung von Schlafstörungen,
München, II., 57 (1982)

6. Lebenslauf

Geburtsdatum:	7. März 1950
Geburtsort:	Lucénec, CSSR
Eltern:	Andrej Merka, Dr. Arzt und Zahnarzt Olga Merka, geb. Guoth, Gartenbau Dipl.Ing.
1956 - 1964:	Grundschule im Lucénec, CSSR
1964 - 1968:	Gymnasium in Bratislava, CSSR
1968:	Abitur
1968 - 1970:	Theaterregie - Studium an der Kunst- hochschule in Bratislava, CSSR
1970 - 1972:	Theaterregiestudium an der Theaterhochschule in Warschau, Polen
1972:	Abschluß Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland, Sprachstudium
1974 - 1975:	Thaterregiestudium an der Volkwang Hochschule in Essen
1975 - 1979:	Schauspielerin, Regieassistentin und Regisseurin an Städtischen Bühnen in Essen, Stadttheatern in Marburg und Augsburg, Staatstheatern in Wiesbaden und Hannover, sowie Festspiele
1979 - 1980:	Studienkolleg in München
1980:	Feststellungsprüfung in München
ab WS 1980/81:	Studium der Zahnmedizin an der LMU München
Sommer 1981:	Vorphysikum
Frühjahr 1983:	Physikum
ab Sommer 1983:	Doktorandin bei Dr. Drasch am Institut für Rechtsmedizin der LMU München
17.01.1986:	Staatsexamen

